

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 026**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 33/24** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2010 PCT/US2010/026315**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO10102175**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2010 E 10708470 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2403878**

54 Título: **Anticuerpos totalmente humanos específicos para CADM1**

30 Prioridad:

**05.03.2009 US 209471 P**  
**05.03.2009 US 209390 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.10.2017**

73 Titular/es:

**OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD. (50.0%)**  
**94A Innovation Drive, Milton Park**  
**94A Milton Park Abingdon, Oxon OX14 4RY, GB y**  
**E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TERRETT, JONATHAN, ALEXANDER;**  
**LEBLANC, HEIDI;**  
**HUANG, HAICHUN;**  
**MEADDOUGH, ERIKA;**  
**PAN, CHIN;**  
**CHEN, BINGLIANG y**  
**RAO-NAIK, CHETANA**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 639 026 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 totalmente humanos específicos para CADM1

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, generalmente, a los campos de la inmunología y la biología molecular. Más específicamente, en la presente descripción se proporcionan anticuerpos, particularmente, anticuerpos genéticamente diseñados que resultan en la unión aumentada a los receptores Fc y/o la potencia aumentada de ADCC e inmunos conjugados, y otras proteínas terapéuticas dirigidas contra la molécula de adhesión de tipo inmunoglobulina CADM1, los ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos y proteínas terapéuticas, los métodos para preparar los anticuerpos monoclonales de la invención y otras proteínas terapéuticas, y los métodos para el tratamiento de enfermedades, tales como cánceres mediados por la expresión/actividad de CADM1 y/o asociados, por lo tanto, con la expresión/actividad anormal de los ligandos.

15

## Antecedentes de la invención

Las moléculas de adhesión celular se identifican, generalmente, como cadherinas, integrinas, selectinas o como miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig). Las moléculas de la superfamilia de inmunoglobulinas incluyen receptores del antígeno de superficie celular, los correceptores y las moléculas coestimuladoras del sistema inmune, las moléculas implicadas en la presentación de antígenos a linfocitos, las moléculas de adhesión celular y algunos receptores de citoquinas. Las moléculas de adhesión celular de la superfamilia de Ig constituyen más de 100 moléculas en los vertebrados e incluyen las NCAM (moléculas de adhesión celular neurales), las CAM de familia L1, ICAMS (moléculas de adhesión celular intracelular), VCAMS (moléculas de adhesión celular vascular), las SIGLEC (lectinas de unión a ácido siálico, que incluyen CD22 y CD83), nectinas, CD2, CD48.

20

La molécula de la superfamilia de inmunoglobulinas CADM1 se caracterizó inicialmente por múltiples grupos de investigación; como resultado la molécula se identifica por muchos nombres en la literatura científica que incluyen la molécula de adhesión celular 1, la molécula de adhesión celular sináptica (synCAM), la molécula de superfamilia de inmunoglobulina espermatogénica (sgIGSF), IGSF4, BL2, ST17, NECL2, RA175 y CADM1A. Inicialmente se reportó que actúa además como un supresor tumoral, además se conoce como TSLC1 (Murakami y otros, *Nature Genetics* 27(4):427 (2001)).

30

A diferencia de las cadherinas e integrinas, que requieren cationes divalentes tales como  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Mg}^{+2}$  para las actividades adhesivas, las moléculas de la superfamilia de Ig son típicamente independientes de  $\text{Ca}^{+2}$  o  $\text{Mg}^{+2}$ . La estructura de CADM1 se caracteriza por tener un dominio extracelular con tres motivos de tipo inmunoglobulina, una sola hélice  $\alpha$  que atraviesa la membrana hidrofóbica y un dominio intracelular que se une a las fibras de actina a través de DAL-1 y una cola citoplásmica C terminal corta que contiene un motivo de unión a PDZ. Se conocen dos isoformas CADM1, NM\_014333 y NM\_001098517, teniendo esta última una delección de 27 aminoácidos. El análisis indica que las secuencias de aminoácidos correspondientes al dominio citoplasmático de CADM1 son idénticas en cinco mamíferos y altamente conservadas en los vertebrados, lo que sugiere un papel importante de CADM1 en la interacción célula-célula normal. El CADM1 de ratón ortólogo (AAQ023810) muestra un 97% de identidad con el CADM1 humano. (Fukami y otros, *Gene* 295:7-12 (2002)).

40

CADM1 se expresa en los nervios y mastocitos (Ito y otros, *J Pharmacol Sci.*;102(1):1-5 (2006)), células alveolares pulmonares (Ito y otros, *Histol Histopathol.* 18(4):1321-9 (2003)), células secretoras pancreáticas (Shingai y otros, *J Biol Chem.*; 278(37):35421-7 (2003)), (Wakayama y otros, *Blood*;101(7):2601-8 (2003)). Además, se asocia con el carcinoma hepatocelular (HCC). CADM1 parece expresarse en las células del conducto biliar fetal y cirrótico del adulto, pero está ausente de los conductos biliares adultos libres de la enfermedad (Ito y otros, *Hepatology*;45(3):684-94 (2007)). Se ha reportado además que se asocia con los glioblastomas y cáncer de pulmón.

50

Se han identificado dos mecanismos que resultan en la inactivación de CADM1: a través de la metilación del promotor, y a través de la pérdida de la heterocigosidad en el locus del gen. La metilación del promotor de CADM1 al parecer resulta en la pérdida de expresión de CADM1 en los tumores, que incluyen cánceres de pulmón, esófago, pancreático, mama y próstata, particularmente, en los tumores con comportamiento agresivo. (Murakami y otros, *Mol Cancer.* 4:28 (2005)).

55

## Resumen de la invención

La presente invención se dirige a estas y otras necesidades relacionadas con anticuerpos que se proporcionan, particularmente, anticuerpos diseñados por ingeniería genética que resultan en el aumento de la unión a receptores Fc y/o aumento de la potencia de ADCC e inmunos conjugados, por lo tanto, dirigidos contra CADM1, los ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos y proteínas terapéuticas, los métodos para preparar anticuerpos monoclonales anti-CADM1 y otras proteínas terapéuticas y los métodos para el tratamiento de enfermedades tales como trastornos mediados por CADM1, p. ej., cánceres humanos, que incluyen cáncer de pulmón de células pequeñas, leucemia de células T adultas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, (que incluyen carcinomas escamosos y adenocarcinomas), melanoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de

60

65

próstata, cánceres neuroendocrinos, que incluyen los de pulmón, suprarrenal, pituitaria, tracto GI, riñón, hígado (que incluyen los carcinomas hepatocelulares), páncreas (que incluyen insulinosomas y glucagonomas), glioblastomas y tumores carcinoides, que incluyen los de páncreas, pulmón, tracto GI, hígado, o riñón.

5 Así, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales aislados, particularmente, anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos, humanizados y totalmente humanos, que por lo tanto, se unen a una o más proteínas y receptores morfogénicos óseos y que exhiben una o más propiedades funcionales convenientes. Tales propiedades incluyen, por ejemplo, la unión específica de alta afinidad a CADM1 humano. Además, se proporcionan los métodos para tratar una variedad de enfermedades mediadas por CADM1 usando los anticuerpos, las proteínas y las composiciones de la presente invención.

10 La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, o un fragmento de anticuerpo que se une a un epítipo en CADM1 humano y comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la sec. con núm. de ident.: 19, 20 o 21 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos que se expone en la sec. con núm. de ident.: 22, 23, o 24. En algunas modalidades, el anticuerpo aislado es un anticuerpo de longitud completa de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

15 En algunas modalidades, el anticuerpo de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla, un inmunoconjugado, un anticuerpo modificado genéticamente que resulta en el aumento de la unión a los receptores Fc y/o aumento de la potencia de ADCC, y un anticuerpo biespecífico. En una modalidad preferida, el anticuerpo de la presente invención es un inmunoconjugado o un anticuerpo diseñado por ingeniería genética que resulta en el aumento de la unión a receptores Fc y/o aumento de la potencia de ADCC. El fragmento de anticuerpo puede ser un UniBody®.

20 En algunas modalidades, los inmunoconjugados de la invención comprenden un agente terapéutico. En otro aspecto de la invención, el agente terapéutico es una citotoxina o un isótopo radiactivo.

25 Además, se describen en la presente descripción miméticos de anticuerpos que consisten en: un Affibody®, un DARPIn®, un Anticalin®, un Avimer®, un Versabody®, y un Duocalin®.

30 En algunos aspectos de la invención, el anticuerpo se une a CADM1 humano con una  $EC_{50}$  de  $< 50$  Nm,  $< 10$  Nm, o  $< 1$  Nm.

35 En modalidades alternativas, las composiciones de la presente invención comprenden un anticuerpo aislado o porción de unión al antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable.

En otros aspectos, el anticuerpo de la presente invención es una composición que comprende el anticuerpo aislado o su porción de unión a antígeno de la reivindicación 1 y un portador farmacéuticamente aceptable.

40 En algunas modalidades, la invención comprende una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o ligera del anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno que se une a un epítipo en CADM1 humano. Otros aspectos de la invención comprenden los vectores de expresión que comprenden tales moléculas de ácido nucleico, y células huésped que comprenden tales vectores.

45 En algunas modalidades, la presente invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-CADM1, dicho método que comprende las etapas de: obtener una célula huésped que contiene una o más moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo de la invención; cultivar las células huésped en un cultivo de células huésped; proporcionar las condiciones de cultivo de las células huésped en donde se expresan una o más moléculas de ácido nucleico; y recuperar el anticuerpo de las células huésped o del cultivo de células huésped.

50 En otras modalidades, la invención se dirige a un anticuerpo anti-CADM1, o su porción de unión al antígeno, para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con las células objetivo que expresan CADM1, en donde la enfermedad tratada o prevenida por el anticuerpo o su porción de unión al antígeno de la invención, es cáncer humano. En algunas modalidades, la enfermedad tratada o prevenida por los anticuerpos de la presente invención es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: cáncer de pulmón de células pequeñas, leucemia de células T adultas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (que incluyen carcinomas escamosos y adenocarcinomas), melanoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cánceres neuroendocrinos que incluyen los de pulmón, suprarrenal, pituitaria, tracto GI, riñón, hígado (que incluyen carcinomas hepatocelulares), páncreas (que incluyen insulinosomas y glucagonomas), glioblastomas, y los tumores carcinoides que incluyen los de páncreas, pulmón, tracto GI, hígado o riñón.

60 En otras modalidades, la invención se refiere al uso de un anticuerpo anti-CADM1, o porción de unión al antígeno de este, para la fabricación de un medicamento para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con células objetivo que expresan CADM1, en donde la enfermedad tratada o prevenida por el medicamento de la invención, es el cáncer humano. En algunas modalidades, la enfermedad tratada o prevenida por el medicamento de la invención es un cáncer seleccionado del grupo que consiste en: cáncer de pulmón de células pequeñas, leucemia de células T

5 adultas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (que incluyen carcinomas escamosos y adenocarcinomas), melanoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cánceres neuroendocrinos que incluyen los de pulmón, suprarrenal, pituitaria, tracto GI, riñón, hígado (que incluyen carcinomas hepatocelulares), páncreas (que incluyen insulinosomas y glucagonomas), glioblastomas y tumores carcinoides que incluyen los de páncreas, pulmón, tracto GI, hígado o riñón.

10 En otras modalidades, la presente invención es un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de unión a antígeno de este, o un fragmento de anticuerpo que se une a un epítipo en CADM1 humano y comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que se expone en la sec. con núm. de ident.:19 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se expone en la sec. con núm. de ident.:22; la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que se expone en la sec. con núm. de ident.:20 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se expone en la sec. con núm. de ident.:23; la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada que se expone en la sec. con núm. de ident.:21 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera que se expone en la sec. con núm. de ident.:24. En aspectos adicionales, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla, un inmunoconjugado, un anticuerpo modificado genéticamente que resulta en el aumento de la unión a receptores Fc y/o aumento de la potencia de ADCC, y un anticuerpo biespecífico. En un aspecto preferido, el anticuerpo es un inmunoconjugado o un anticuerpo modificado genéticamente que resulta en el aumento de la unión a los receptores Fc y/o aumento de la potencia de ADCC. En otros aspectos de la invención, el fragmento de anticuerpo es un UniBody®. Los miméticos de anticuerpos descritos en la presente descripción son: un Affibody®, un DARPin®, un Anticalin, un Avimer®, un Versabody®, y un Duocalin®. En otras modalidades, la composición comprende el anticuerpo aislado o su porción de unión al antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable.

25 En algunas modalidades, la presente invención es una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o ligera del anticuerpo aislado o la porción de unión al antígeno del anticuerpo de la invención, y en otros aspectos puede incluir un vector de expresión que comprende tales ácidos nucleicos y células huésped que comprenden tales vectores de expresión.

30 Otra modalidad de la presente invención es un hibridoma que expresa el anticuerpo o la porción de unión al antígeno de cualquiera de los anticuerpos de la invención.

35 Otros aspectos de la invención se refieren a métodos para preparar los anticuerpos de la invención, que comprenden las etapas de: inmunizar un animal transgénico que comprende los genes de la inmunoglobulina humana con un péptido CADM1; recuperar las células B de dicho animal transgénico; preparar hibridomas a partir de dichas células B; seleccionar los hibridomas que expresan anticuerpos que se unen a CADM1; y recuperar dichos anticuerpos que se unen a CADM1 de dichos hibridomas seleccionados.

40 En otras modalidades, el método para preparar anticuerpos anti-CADM1, comprende las etapas de: inmunizar un animal transgénico que comprende genes de inmunoglobulina humana con un péptido CADM1; recuperar el ARNm de las células B de dicho animal transgénico; convertir dicho ARNm en ADNc; convertir dicho ARNm en ADNc; expresar dicho ADNc en fagos de manera que los anticuerpos anti-CADM1 codificados por dicho ADNc se presenten en la superficie de dichos fagos; seleccionar los fagos que presentan los anticuerpos anti-CADM1; recuperar las moléculas de ácido nucleico a partir de dichos fagos seleccionados que codifican dichas inmunoglobulinas anti-CADM1; expresar dichas moléculas de ácido nucleico recuperadas en una célula huésped; y recuperar de dicha célula huésped los anticuerpos que se unen a CADM1.

50 En un ejemplo, el anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión al antígeno de este, se une a un epítipo en el polipéptido CADM1 que tiene una secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 43 ó 44 reconocida por un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las sec. con núms. de ident.: 19, 20 ó 21 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las sec. con núms. de ident.: 22, 23, o 24.

60 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos que no deben interpretarse como limitativos.

#### Breve descripción de los dibujos

65 La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident.: 25) y la secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident.:19) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano PTA021\_A1. Se

- delinean las regiones CDR1 (sec. con núm. de ident.:1), CDR2 (sec. con núm. de ident.:4) y CDR3 (sec. con núm. de ident.:7) y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, D y J.
- 5 La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident.:28) y la secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident.:22) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano PTA021\_A1. Se delinean las regiones CDR1 (sec. con núm. de ident.:10), CDR2 (sec. con núm. de ident.:13) y CDR3 (sec. con núm. de ident.:16) y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, y J.
- 10 La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident.:26) y la secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident.:20) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano PTA021\_A2. Se delinean las regiones CDR1 (sec. con núm. de ident.:2), CDR2 (sec. con núm. de ident.:5) y CDR3 (sec. con núm. de ident.:8) y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, y J.
- 15 La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident.:29) y la secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident.:23) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano PTA021\_A2. Se delinean las regiones CDR1 (sec. con núm. de ident.:11), CDR2 (sec. con núm. de ident.:14) y CDR3 (sec. con núm. de ident.:17) y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, y J.
- 20 La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident.:27) y la secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident.:21) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano PTA021\_A3. Se delinean las regiones CDR1 (sec. con núm. de ident.:3), CDR2 (sec. con núm. de ident.:6) y CDR3 (sec. con núm. de ident.:9) y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, D y J.
- 25 La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident.:30) y la secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident.:24) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano PTA021\_A3. Se delinean las regiones CDR1 (sec. con núm. de ident.:12), CDR2 (sec. con núm. de ident.:15) y CDR3 (sec. con núm. de ident.:18) y se indican las derivaciones de las líneas germinales V, y J.
- 30 La Figura 4 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de PTA021\_A1 (sec. con núm. de ident.:19) con la secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> 2-05 de la línea germinal humana (sec. con núm. de ident.:31) y la secuencia de aminoácidos de J<sub>H</sub> JH5b de la línea germinal humana (sec. con núm. de ident.:37).
- 35 La Figura 5 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de PTA021\_A2 (sec. con núm. de ident.:20) con las secuencias de aminoácidos de V<sub>H</sub> 2-05 de la línea germinal humana (sec. con núm. de ident.:32) y la secuencia de aminoácidos de J<sub>H</sub> 5b de la línea germinal humana (sec. con núm. de ident.:38).
- 40 La Figura 6 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de PTA021\_A3 (sec. con núm. de ident.:21) con las secuencias de aminoácidos de V<sub>H</sub> 2-05 de la línea germinal humana (sec. con núm. de ident.:33) y la secuencia de aminoácidos de J<sub>H</sub> 5b de la línea germinal humana (sec. con núm. de ident.:39).
- 45 La Figura 7 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de PTA021\_A1 (sec. con núm. de ident.:22) con las secuencias de aminoácidos de V<sub>K</sub> L15 de la línea germinal humana (sec. con núm. de ident.:34) y la secuencia de aminoácidos de J<sub>K</sub> 4 de la línea germinal humana (sec. con núm. de ident.:40).
- 50 La Figura 8 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de PTA021\_A2 (sec. con núm. de ident.:23) con las secuencias de aminoácidos de V<sub>K</sub> L15 de la línea germinal humana (sec. con núm. de ident.:35) y la secuencia de aminoácidos de J<sub>K</sub> 4 de la línea germinal humana (sec. con núm. de ident.:41).
- 55 La Figura 9 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de PTA021\_A3 (sec. con núm. de ident.:24) con las secuencias de aminoácidos de V<sub>K</sub> L15 de la línea germinal humana (sec. con núm. de ident.:36) y la secuencia de aminoácidos de J<sub>K</sub> 4 de la línea germinal humana (sec. con núm. de ident.:42).
- 60 La Figura 10 muestra los resultados del análisis FACS en PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3 en células de cáncer de pulmón de células pequeñas NCI-H69.
- Las Figuras 11A y 11B muestran los resultados del análisis FACS en PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3 en células de cáncer de pulmón de células pequeñas NCI-H69 y DMS79, respectivamente.
- 65 La Figura 12 muestra los resultados del análisis FACS en PTA021\_A3 en células de cáncer de ovario SKOV3.

La Figura 13 muestra los resultados del análisis FACS en PTA021\_A3 en células de cáncer de pulmón de células no pequeñas A549.

5 La Figura 14 muestra los resultados del análisis FACS en PTA021\_A3 en células de carcinoma de células renales 786-O y células de melanoma SkMel28.

La Figura 15 muestra los resultados del análisis FACS en PTA021\_A3 y la versión no fucosilada de PTA021 A3 (nf) en células de cáncer de pulmón de células pequeñas NCI-H69 y DMS79.

10 Las Figuras 16A y 16B muestran la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediada por PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3 con las líneas celulares DMS79 y NCI-H69, respectivamente.

15 Las Figuras 17A y 17B muestran los resultados de los ensayos Hum-ZAP en PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3 en células DMS79 y NCI-H69 respectivamente.

La Figura 18 presenta un gráfico que muestra el efecto del tratamiento usando anticuerpos PTA021\_A3 fucosilados o no fucosilados sobre el tamaño del tumor HepG2 en un modelo de xenoinjerto de ratón.

20 La Figura 19 presenta un gráfico que muestra el efecto del tratamiento con un conjugado de PTA021\_A3-Fórmula M sobre el tamaño del tumor HepG2 en un modelo de xenoinjerto de ratón.

25 La Figura 20A presenta un gráfico que muestra el efecto del tratamiento con dosificaciones de 0,3 umol/kg de un conjugado de PTA021\_A3-Fórmula M sobre el tamaño del tumor DMS79 en un modelo de xenoinjerto de ratón. La Figura 20B presenta un gráfico que muestra el efecto del tratamiento con dosificaciones de 0,1 y 0,03 umol/kg de un conjugado de PTA021\_A3-Fórmula M sobre el tamaño del tumor DMS79 en un modelo de xenoinjerto de ratón. El estudio se completó el día 60.

30 Las Figuras 21, 22 y 23 presentan gráficos que muestran actividad de ADCC de PTA021\_A3 y PTA021 A3 no fucosilada sobre células HepG2, 786-O y DMS79, respectivamente.

La Figura 24 presenta un gráfico que muestra el efecto del tratamiento con el anticuerpo PTA021\_A3 solo o en combinación con cisplatino sobre el tamaño del tumor DMS79 en un modelo de xenoinjerto de ratón.

35 Las Figuras 25A y 25B muestran los datos del Peso Corporal para monos machos y monos hembra, respectivamente, en un estudio exploratorio de toxicología sobre PTA021\_A3 y la versión no fucosilada de PTA021\_A3 (NF) en macacos cynomolgus.

40 Las Figuras 26A y 26B muestran los datos de la glucosa para monos machos y monos hembra respectivamente en un estudio exploratorio de toxicología sobre PTA021\_A3 y la versión no fucosilada de PTA021\_A3 (NF) en macacos cynomolgus.

45 Las Figuras 27A y 27B muestran los datos de la alanina transaminasa para monos machos y monos hembra, respectivamente, en un estudio exploratorio de toxicología sobre PTA021\_A3 y la versión no fucosilada de PTA021\_A3 (NF) en macacos cynomolgus.

Las Figuras 28A y 28B muestran los datos de la aspartato transaminasa para monos machos y monos hembra respectivamente en un estudio exploratorio de toxicología sobre PTA021\_A3 y la versión no fucosilada de PTA021\_A3 (NF) en macacos cynomolgus.

50 Las Figuras 29A y 29B muestran los datos de la fosfatasa alcalina para monos machos y monos hembra, respectivamente, en un estudio exploratorio de toxicología sobre PTA021\_A3 y la versión no fucosilada de PTA021\_A3 (NF) en macacos cynomolgus.

55 Las Figuras 30A y 30B muestran los datos de la lactato deshidrogenasa para monos machos y monos hembra, respectivamente, en un estudio exploratorio de toxicología sobre PTA021\_A3 y la versión no fucosilada de PTA021\_A3 (NF) en macacos cynomolgus.

60 Las Figuras 31A y 31B muestran los datos de RBC para monos machos y monos hembra respectivamente en un estudio exploratorio de toxicología sobre PTA021\_A3 y la versión no fucosilada de PTA021\_A3 (NF) en macacos cynomolgus.

#### Descripción detallada de la invención

65 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales aislados, particularmente anticuerpos monoclonales humanos, más particularmente inmunocombinados y anticuerpos diseñados por ingeniería genética que resultan en el aumento de la unión a receptores Fc y/o aumento de la potencia de ADCC, que se unen específicamente a CADM1 con

alta afinidad. Los anticuerpos de la invención se derivan de secuencias de la cadena pesada y de la cadena ligera germinal y/o comprenden características estructurales particulares tales como las regiones CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos particulares. La invención proporciona anticuerpos aislados, anticuerpos diseñados por ingeniería genética que resultan en un aumento de la unión a receptores Fc y/o aumento de la potencia de ADCC, inmunconjugados, moléculas biespecíficas. Además se describen en la presente descripción Affibody®, anticuerpos de dominio, Nanobody®, y Unibody®. La invención proporciona además, métodos para fabricar dichas moléculas y composiciones farmacéuticas que comprenden dichas moléculas y un portador farmacéutico. La invención se refiere además, al tratamiento de las enfermedades asociadas con la expresión de CADM1, tales como CADM1 expresada en tumores, que incluyen tumores de cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de páncreas neuroendocrino, carcinoides de pulmón y carcinoides gastrointestinales. Además, se describen métodos para usar las moléculas, tales como para detectar CADM1.

Para que la presente invención pueda comprenderse más fácilmente, ciertos términos se definen primero. Las definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

Los términos "CADM1", "IGSF4", "superfamilia de inmunoglobulinas, miembro 4D", "molécula de adhesión celular 1", "supresor de tumor en cáncer de pulmón 1", "TSLC1", "BL2", "ST 17", "molécula de adhesión de la célula sináptica", "syncam 1", "proteína 2 de tipo nectina" y "NECL2" se usan indistintamente e incluyen variantes, isoformas y homólogos de especies de CADM1 humano, que incluyen la isoforma 1 de CADM1 (Números de Acceso del Genbank M\_014333), y 2 (Números de Acceso del Genbank NM\_001098517). Las dos isoformas además se han identificado como OGTA025a y OGTA025b en el documento de patente PCT del documento de patente WO2008/026010. Los anticuerpos humanos de esta descripción pueden, en ciertos casos, reaccionar de forma cruzada con CADM1 de especies distintas a la humana. En ciertas modalidades, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para uno o más CADM1 humano y pueden no exhibir reactividad cruzada de especie o de otros tipos no humanos. La secuencia de aminoácidos completa de un CADM1 humano ilustrativo tiene el número de acceso del Genbank NM\_014333.

El término "respuesta inmune" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (que incluyen anticuerpos, citoquinas y complemento) que resulta en el daño selectivo a, destrucción de, o eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una "vía de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre varias moléculas de transducción de señales que juegan un papel en la transmisión de una señal de una porción de una célula a otra porción de una célula. Como se usa en la presente descripción, la frase "receptor de superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" de la presente invención es el receptor CADM1.

El término "anticuerpo" como se menciona en la presente, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "porción de unión al antígeno") o cadenas sencillas de estos. Un "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que puede comprender al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión al antígeno de este. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente descripción como  $V_H$ ) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente descripción como  $V_L$  o  $V_K$ ) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  /  $V_K$  pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  /  $V_K$  se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestos desde el extremo amino terminal hasta el extremo carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, que incluyen varias células del sistema inmune (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se usa en la presente descripción, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (p. ej., CADM1). Se demostró que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse por los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$  /  $V_K$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$ ; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab' que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (ver, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993); (iv) un fragmento Fd que consiste en los dominios de  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un único brazo de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward y otros, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio  $V_H$ ; (vii) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada y (viii) un

Nanobody®, una región variable de la cadena pesada que contiene un solo dominio variable y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V<sub>L</sub> / V<sub>K</sub> y V<sub>H</sub>, se codifican por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un ligando sintético que les permite conformar una única cadena proteica en la que las regiones V<sub>L</sub> / V<sub>K</sub> y V<sub>H</sub> se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); verp. ej., Bird y otros, (1988) *Science* 242:423-426; y Huston y otros, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla pretenden además, estar comprendidos dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por aquellos con experiencia en la técnica, y los fragmentos se tamizan por la utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a un anticuerpo que está esencialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a CADM1 está esencialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a los antígenos distintos de CADM1). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a CADM1 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas CADM1 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o químicos.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente descripción se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular.

El término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, pretende incluir los anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o de sitio específico *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en la presente descripción, no pretende incluir los anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado sobre secuencias marco humanas.

El término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las CDR se derivan de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, p. ej., un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de la cadena pesada humana y un transgén de la cadena ligera fusionada con una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en la presente descripción, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de la inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de estos (descritos también, más abajo), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, p. ej., a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una genoteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante, y d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias génicas de la inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones marco y CDR se derivan de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Sin embargo, en ciertas modalidades, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática, *in vivo*) y, así, las secuencias de aminoácidos de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> / V<sub>K</sub> de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan y relacionan con las secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> / V<sub>K</sub> de la línea germinal humana, no pueden existir naturalmente dentro del repertorio germinal del anticuerpo humano *in vivo*.

Como se usa en la presente descripción, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (p. ej., IgM o IgG1) que está codificado por los genes de la región constante de la cadena pesada.

Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en la presente descripción con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

El término "derivados de anticuerpos humanos" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, p. ej., un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

El término "anticuerpo humanizado" pretende incluir los anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en las secuencias marco humanas. Pueden realizarse modificaciones adicionales de la región marco dentro de las secuencias del marco humano.

El término "anticuerpo quimérico" pretende referirse a anticuerpos en los que las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de región variable se derivan de un ratón y las secuencias de las regiones constantes se derivan de un anticuerpo humano.

5

Como se usa en la presente descripción, un anticuerpo que "se une específicamente a CADM1 humano" pretende referirse a un anticuerpo que se une al CADM1 humano con una  $EC_{50}$  de 50 Nm o menos, 10 Nm o menos, o con mayor preferencia 1 Nm o menos.

10

El término "no se une esencialmente" a una proteína o células, como se usa en la presente descripción, significa que no se une o no se une con una alta afinidad a la proteína o células, es decir, se une a la proteína o células con un  $K_D$  de  $1 \times 10^{-6}$  M o más, con mayor preferencia  $1 \times 10^{-5}$  M o más, con mayor preferencia  $1 \times 10^{-4}$  M o más, con mayor preferencia  $1 \times 10^{-3}$  M o más, aún con mayor preferencia  $1 \times 10^{-2}$  M o más.

15

El término " $EC_{50}$ " como se usa en la presente descripción, se refiere a la potencia de un compuesto mediante la cuantificación la concentración que conduce a un 50% de respuesta/efecto máximo.

20

El término " $K_{asoc}$ " o " $K_a$ ", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a la velocidad de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno en particular, mientras que el término " $K_{dis}$ " o " $K_d$ ", como se usa en la presente descripción pretende referirse a la velocidad de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno en particular. El término " $K_D$ ", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de  $K_d$  con  $K_a$  (es decir,  $K_d/K_a$ ) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de  $K_D$  pueden determinarse para los anticuerpos usando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferido para determinar  $K_D$  de un anticuerpo es usando resonancia de plasmón superficial, preferentemente usando un sistema de biosensor tal como un sistema Biacore®.

25

Como se usa en la presente descripción, el término "alta afinidad" de un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos, con mayor preferencia  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, aun con mayor preferencia  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, aun con mayor preferencia  $5 \times 10^{-9}$  M o menos y aun con mayor preferencia  $1 \times 10^{-9}$  M o menos para un antígeno objetivo. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la unión de "alta afinidad" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  de  $10^{-6}$  M o menos, con mayor preferencia  $10^{-7}$  M o menos, aun con mayor preferencia  $10^{-8}$  M o menos.

30

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio sobre un antígeno al que se une específicamente una inmunoglobulina o anticuerpo. Los epítipos pueden formarse tanto de aminoácidos contiguos o de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítipos formados a partir de los aminoácidos contiguos típicamente se conservan con la exposición a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítipos formados por el plegamiento terciario típicamente se pierden en el tratamiento con disolventes desnaturalizantes. Un epítipo incluye típicamente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítipos incluyen los procedimientos descritos en la técnica y los descritos en la presente descripción, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional (ver, p. ej., *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

35

40

45

En consecuencia, además se describen en la presente descripción anticuerpos que se unen (es decir, quereconocen) al mismo epítipo que los anticuerpos descritos en la presente descripción (es decir, PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3). Los anticuerpos que se unen al mismo epítipo pueden identificarse por su capacidad para competir de forma cruzada con (es decir, inhibir competitivamente la unión de) un anticuerpo de referencia a un antígeno objetivo de una manera estadísticamente significativa. La inhibición competitiva puede ocurrir, por ejemplo, si los anticuerpos se unen a epítipos idénticos o estructuralmente similares (p. ej., epítipos superpuestos), o epítipos espacialmente proximales que, cuando se unen, causan impedimento estérico entre los anticuerpos.

50

La inhibición competitiva puede determinarse usando ensayos de rutina en los que la inmunoglobulina a prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto en fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto en fase sólida (EIA), ensayo de competición en sándwich (ver Stahl y otros, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (ver Kirkland y otros, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensayo de marcaje directo en fase sólida, ensayo sándwich de marcaje directo en fase sólida Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marcaje directo en fase sólida usando la etiqueta I-125 (ver Morel y otros, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung y otros, *Virology* 176:546 (1990)); y RIA de marcaje directo. (Moldenhauer y otros, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Típicamente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan cualquiera de éstos, una inmunoglobulina a prueba sin marcar y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de etiqueta unida a la superficie sólida o las células en presencia de la inmunoglobulina a prueba. Por lo general, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Generalmente, cuando un anticuerpo

55

60

65

competidor está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común al menos en un 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% o más.

Otras técnicas incluyen, por ejemplo, métodos de mapeo de epítomos, tales como análisis por rayos X de cristales de complejos antígeno:anticuerpo que proporcionan la resolución atómica del epítipo. Otros métodos monitorean la unión del anticuerpo a fragmentos del antígeno o variantes mutadas del antígeno donde la pérdida de la unión debido a una modificación de un residuo de aminoácido dentro de la secuencia del antígeno se considera una indicación de un componente de epítipo. Además, pueden usarse también, los métodos combinatorios computacionales para el mapeo de epítomos. Estos métodos se basan en la capacidad del anticuerpo de interés para aislar con afinidad a péptidos cortos específicos de genotecas combinatorias de presentación de péptidos en la superficie de fagos. Los péptidos se consideran entonces como pistas para la definición del epítipo correspondiente a los anticuerpos usados para seleccionar la genoteca de péptidos. Para el mapeo de epítomos, se han desarrollado además, los algoritmos de cálculo los que han demostrado mapear epítomos discontinuos conformacionales.

Como se usa en la presente descripción, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, p. ej., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

Varios aspectos de la invención se describen en más detalle en las siguientes subsecciones.

#### Anticuerpos Anti-CADM1

Los anticuerpos de la invención se caracterizan mediante las características funcionales particulares o propiedades de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente a CADM1 humano. Preferentemente, un anticuerpo de la invención se une a CADM1 con alta afinidad, por ejemplo con una  $K_D$  de  $8 \times 10^{-7}$  M o menos, aún más típicamente  $1 \times 10^{-8}$  M o menos. Los anticuerpos anti-CADM1 de la invención presentan preferentemente una o más de las siguientes características:

se une a CADM1 humano con una  $EC_{50}$  de 50 Nm o menos, 10 Nm o menos, o con mayor preferencia 1 Nm o menos;

se une a células humanas que expresan CADM1.

En una modalidad, los anticuerpos se unen preferentemente a un epítipo antigénico presente en CADM1, cuyo epítipo no está presente en otras proteínas. Los anticuerpos típicamente se unen a CADM1 pero no se unen a otras proteínas, o se unen a las proteínas con una afinidad baja, tal como una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-6}$  M o más, con mayor preferencia  $1 \times 10^{-5}$  M o más, con mayor preferencia  $1 \times 10^{-4}$  M o más, con mayor preferencia  $1 \times 10^{-3}$  M o más, aún con mayor preferencia  $1 \times 10^{-2}$  M o más. Preferentemente, los anticuerpos no se unen a proteínas relacionadas, por ejemplo, los anticuerpos no se unen sustancialmente a las ICAM, VCAM u otras moléculas de adhesión celular. En una modalidad, el anticuerpo puede internalizarse en una célula que expresa CADM1. En la técnica se conocen ensayos estándar para evaluar la internalización de anticuerpos, que incluyen, por ejemplo, un ensayo de internalización HumZap.

En la técnica se conocen ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos hacia CADM1, que incluyen, por ejemplo, los ELISA, membranas de transferencia de tipo Western, RIA y análisis por citometría de flujo. Los ensayos adecuados se describen en detalle en los Ejemplos. La cinética de unión (p. ej., afinidad de unión) de los anticuerpos además se puede evaluar mediante ensayos estándar conocidos en la técnica, tal como por análisis de sistemaBiacore®. Para evaluar la unión a células tumorales de células B de Raji o Daudi, pueden obtenerse células Raji (ATCC núm. de Depósito CCL-86) o Daudi (ATCC núm. de Depósito CCL-213) a partir de fuentes disponibles públicamente, tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo, y usarse en ensayos estándar, tales como análisis por citometría de flujo.

#### Anticuerpos monoclonales PTA021 A1, PTA021 A2, PTA021 A3

Los anticuerpos preferidos de la invención son los anticuerpos monoclonales humanos PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3, aislados y estructuralmente caracterizados como se describe en los Ejemplos 1, 2 y 3. Las secuencias de aminoácidos de  $V_H$  de PTA021\_A1, PTA021\_A2, y PTA021\_A3 se muestran en las sec. con núms. de ident.:19, 20, y 21, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de  $V_K$  de PTA021\_A1, PTA021\_A2, y PTA021\_A3 se muestran en las sec. con núms. de ident.:22, 23, y 24, respectivamente.

Dado que cada uno de estos anticuerpos pueden unirse a CADM1, las secuencias de  $V_H$  y  $V_K$  pueden "mezclarse y combinarse" para crear otras moléculas de unión anti-CADM1 de la invención. La unión CADM1 de tales anticuerpos "mezclados y combinados" puede probarse usando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos (p. ej., los ELISA). Preferentemente, cuando las cadenas de  $V_H$  y  $V_K$  se mezclan y combinan, una secuencia  $V_H$  de un apareamiento de  $V_H/V_K$  en particular se sustituye con una secuencia  $V_H$  estructuralmente similar. Similarmente, una secuencia  $V_K$  preferentemente de un apareamiento de  $V_H/V_K$  en particular se sustituye con una secuencia  $V_K$  estructuralmente similar.

En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o su porción de unión al antígeno que comprende:

una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.:19, 20, y 21; y

5 una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.:22, 23, y 24;

en donde el anticuerpo se une específicamente a CADM1, preferentemente CADM1 humano.

Las combinaciones preferidas de las cadenas pesada y ligera incluyen:

10 una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:19 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:22; o

una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:20; y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:23, o

15 una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:21; y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:24.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada y la cadena ligera de PTA021\_A1, PTA021\_A2, y PTA021\_A3. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V<sub>H</sub> de

20 PTA021\_A1, PTA021\_A2, y PTA021\_A3 se muestran en las sec. con núms. de ident.: 1,2, y 3. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V<sub>H</sub> de PTA021\_A1, PTA021\_A2, y PTA021\_A3 se muestran en las sec. con núms. de ident.: 4, 5, y 6. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V<sub>H</sub> de PTA021\_A1, PTA021\_A2, y PTA021\_A3 se muestran en las sec. con núms. de ident.:7, 8, y 9. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de V<sub>K</sub> de PTA021\_A1,

PTA021\_A2, y PTA021\_A3 se muestran en las sec. con núms. de ident.: 10, 11, y 12. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de V<sub>K</sub> de PTA021\_A1, PTA021\_A2, y PTA021\_A3 se muestran en las sec. con núms. de ident.:13, 14, y 15.

25 Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de V<sub>K</sub> de PTA021\_A1, PTA021\_A2, y PTA021\_A3 se muestran en las sec. con núms. de ident.: 16, 17, y 18. Las regiones de CDR se delimitan usando el sistema Kabat (Kabat, E. A., y otros (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publicación Núm. 91-3242).

30 Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a CADM1 y que la especificidad de unión al antígeno se proporciona principalmente por las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de V<sub>H</sub> y las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 de V<sub>K</sub> pueden "mezclarse y combinarse" (es decir, las CDR de diferentes anticuerpos pueden mezclarse y combinarse, aunque cada anticuerpo contenga una CDR1, CDR2, y CDR3 de V<sub>H</sub> y una CDR1, CDR2, y CDR3 de V<sub>K</sub>) para crear otras moléculas de unión anti-CADM1. La unión CADM1 de tales anticuerpos

35 "mezclados y combinados" puede probarse usando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos (p. ej., los ELISA, análisis mediante Biacore<sup>®</sup>). Preferentemente, cuando se mezclan y combinan las secuencias CDR de V<sub>H</sub>, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V<sub>H</sub> en particular se sustituye con una(s) secuencia(s) CDR estructuralmente similar(es). Similarmente, cuando se mezclan y combinan las secuencias CDR de V<sub>K</sub>, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V<sub>K</sub> en particular se sustituye con una(s) secuencia(s) CDR estructuralmente similar(es). Será fácilmente evidente para el técnico con experiencia que pueden crearse nuevas secuencias V<sub>H</sub> y V<sub>K</sub> sustituyendo una o más secuencias de la región CDR de V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub> V<sub>K</sub> con secuencias estructuralmente similares de las secuencias CDR descritas en la presente descripción para los anticuerpos monoclonales PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3.

40 Además se describe en la presente descripción un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno de este que comprende:

45 una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.:1, 2, y 3;

50 una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.:4, 5, y 6;

una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.:7, 8, y 9;

una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.:10, 11, y 12;

55 una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.:13, 14, y 15; y

una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.:16, 17, y 18;

en donde el anticuerpo se une específicamente a CADM1, preferentemente CADM1 humano.

60 En una modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.:1;

una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 4;

una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 7;

65 una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 10;

una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 13; y

una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 16.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 2;  
 5 una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 5;  
 una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 8;  
 una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 11;  
 una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 14; y  
 una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 17.

En otra modalidad preferida, el anticuerpo comprende:

una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 3;  
 una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.:6;  
 una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.:9;  
 15 una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 12;  
 una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 15; y  
 una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 18.

Se conoce bien en la técnica que el dominio CDR3, independientemente de los dominios CDR1 y/o CDR2, puede  
 20 determinar por sí solo la especificidad de unión de un anticuerpo para un antígeno afín y que pueden generarse de  
 manera predecible múltiples anticuerpos que tienen la misma especificidad de unión basada en una secuencia CDR3  
 común ver, por ejemplo, Klimka y otros, *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000) (que describe la producción de un  
 anticuerpo anti-CD30 humanizado usando solo la CDR3 del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo  
 25 murino anti-CD30 Ki-4); Beiboer y otros, *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000) (que describe los anticuerpos recombinantes  
 de la glicoproteína epitelial 2 (EGP-2) usando sólo la secuencia CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo murino  
 parental MOC-31 anti-EGP-2); Rader y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998) (que describe un panel  
 de anticuerpos anti-integrina  $\alpha_v\beta_3$  humanizados usando un dominio CDR3 variable de la cadena pesada y ligera de un  
 anticuerpo murino anti-integrina  $\alpha_v\beta_3$ LM609 en donde cada anticuerpo miembro comprende una secuencia distinta fuera  
 30 del dominio CDR3 y capaz de unirse al mismo epítipo que el anticuerpo murino parental con afinidades tan altas o más  
 altas que el anticuerpo murino parental); Barbas y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994) (que describe que el  
 dominio CDR3 proporciona la contribución más significativa a la unión al antígeno); Barbas y otros, *Proc. Natl. Acad.  
 Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995) (que describe el injerto de secuencias CDR3 de la cadena pesada de tres Fab (SI-1,  
 SI-40 y SI-32) contra el ADN de la placenta humana sobre la cadena pesada de un Fab anti-toxoide tetánico  
 35 sustituyendo de ese modo la CDR3 de la cadena pesada existente y demostrando que el dominio CDR3 solo confiere la  
 especificidad de unión); y Ditzel y otros, *J. Immunol.* 157:739-749 (1996) (que describe los estudios de injerto en donde  
 la transferencia de sólo la CDR3 de la cadena pesada de un Fab LNA3 parental poliespecífico de una cadena pesada  
 de un anticuerpo IgG Fab p313 mono-específico de unión al toxoide tetánico fue suficiente para conservar la  
 especificidad de unión del Fab parental).

En consecuencia, se describen en la presente descripción anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más  
 40 dominios de CDR3 de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo derivado de un animal humano o no humano, en  
 donde el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente a CADM1. Además, se describen anticuerpos  
 monoclonales que comprenden uno o más dominios de CDR3 de la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no  
 humano, tal como un anticuerpo de ratón o de rata, en donde el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse  
 45 específicamente a CADM1. En algunos ejemplos, tales anticuerpos que comprenden uno o más dominios de CDR3 de  
 la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano (a) son capaces de competir por la unión con; (b) conservar las  
 características funcionales; (c) unirse al mismo epítipo; y/o (d) tener una afinidad de unión similar que el anticuerpo  
 parental no humano correspondiente.

En otros ejemplos, se proporcionan anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios de CDR3 de la  
 50 cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal  
 no humano, en donde el anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente a CADM1. En otros ejemplos, se  
 proporcionan anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera de  
 un primer anticuerpo humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal no humano, en  
 55 donde el primer anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente a CADM1 y en donde el dominio CDR3 del  
 primer anticuerpo humano sustituye un dominio CDR3 en un anticuerpo humano que carece de especificidad de unión a  
 CADM1 para generar un segundo anticuerpo humano que es capaz de unirse específicamente a CADM1. En algunos  
 ejemplos, los anticuerpos que comprenden uno o más dominios CDR3 de la cadena pesada y/o ligera del primer  
 anticuerpo humano (a) son capaces de competir por la unión con; (b) conservar las características funcionales; (c)  
 60 unirse al mismo epítipo; y/o (d) tener una afinidad de unión similar que el primer anticuerpo humano parental. En  
 ejemplos preferidos, el primer anticuerpo humano es PTA021\_A1, PTA021\_A2 o PTA021\_A3.

Anticuerpos que tienen secuencias germinales particulares

5 En ciertas modalidades, un anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena pesada de un gen en particular, de inmunoglobulina de cadena pesada germinal y/o una región variable de la cadena ligera de un gen en particular, de la inmunoglobulina de cadena ligera de la línea germinal.

10 Por ejemplo, en una modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o derivado de un gen  $V_H$  2-05 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente a CADM1. Aun en otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o derivado de un gen  $V_K$  L15 humano, en donde el anticuerpo se une específicamente a CADM1. Aun en otra modalidad preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno de este, en donde el anticuerpo:

15 comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o derivado de un gen  $V_H$  2-05 humano (genes que codifican las secuencias de aminoácidos expuestas en las sec. con núms. de ident.: 31, 32, o 33, respectivamente);  
comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o derivado de un gen  $V_K$  L15 humano (genes que codifican las secuencias de aminoácidos expuestas en las sec. con núms. de ident.: 34, 35, o 36, respectivamente);  
y

20 se une específicamente a CADM1, preferentemente CADM1 humano. Los anticuerpos que tienen  $V_H$  y  $V_K$  de  $V_H$  2-05 y  $V_K$  L15, respectivamente, son PTA021\_A1, PTA021\_A2, y PTA021\_A3.

25 Como se usa en la presente descripción, un anticuerpo humano comprende las regiones variables de la cadena pesada o ligera que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia germinal en particular, si las regiones variables del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que usa genes de la inmunoglobulina de la línea germinal humana. Tales sistemas incluyen inmunizar un ratón transgénico que porta los genes de la inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o tamizar una genoteca de la inmunoglobulina humana presentada en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las

30 secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana y seleccionando la secuencia de la inmunoglobulina de la línea germinal humana que es la más cercana en secuencia (es decir, mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia en particular de la inmunoglobulina de la línea germinal humana puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia germinal, debido, por ejemplo, a mutaciones somáticas de origen natural o introducción intencional de la mutación de sitiodirigido. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos

35 90% idéntico en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de la inmunoglobulina de la línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se compara con las secuencias de aminoácido de la inmunoglobulina de líneas germinales de otras especies (p. ej., secuencias de líneas germinales murinas). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al

40 menos 95% o incluso al menos 96%, 97%, 98% o 99% idéntico en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la inmunoglobulina germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado en particular, de una secuencia de la línea germinal humana mostrará no más de 10 aminoácidos de diferencia de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia de aminoácidos de la

45 secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina germinal.

Anticuerpos homólogos

50 Se describen en la presente descripción anticuerpos que comprenden regiones variables de la cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en la presente descripción y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-CADM1 de la invención.

55 Por ejemplo, se describe un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión al antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde:  
la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.:19, 20, y 21;  
la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% homóloga a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.:22, 23, y 24; y  
60 el anticuerpo se une al CADM1 humano con una  $EC_{50}$  de 10 Nm o menos.

El anticuerpo, además, puede unirse a células CHO transfectadas con CADM1 humano.

65 El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

En otros ejemplos, las secuencias de aminoácidos  $V_H$  y/o  $V_K$  pueden ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homólogas a las secuencias expuestas anteriormente. Un anticuerpo que tiene regiones  $V_H$  y  $V_K$  que tienen alta homología (es decir, 80% o más) con las regiones  $V_H$  y  $V_K$  de las secuencias expuestas anteriormente, puede obtenerse por mutagénesis (p. ej., mutagénesis de sitio dirigido o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican las sec. con núms. de ident.:25, 26, 27, 28, 29, y 30, seguido por la prueba del anticuerpo codificado y alterado para la función conservada usando los ensayos funcionales descritos en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, (es decir, % homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de interrupciones, y la longitud de cada interrupción, que necesitan introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitativos más abajo.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de peso residual PAM120, una penalización por la longitud de interrupción de 12 y una penalización por interrupción de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.*48:444-453 (1970)) que se incorporó en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en [www.gcg.com](http://www.gcg.com)), usando o bien una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de la interrupción de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Adicionalmente o alternativamente, las secuencias de proteína de la presente invención pueden usarse además, como una "secuencia problema" para realizar una búsqueda contra bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar las secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse usando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, y otros (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de proteína BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de los anticuerpos de la invención. Para obtener las alineaciones con interrupción para propósitos de comparación, puede utilizarse el Gapped BLAST como se describió en Altschul y otros, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y gapped BLAST, pueden usarse los parámetros predeterminados de los programas respectivos (p. ej., XBLAST y NBLAST). Ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

#### Anticuerpos con modificaciones conservativas

En ciertos ejemplos, un anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias CDR comprenden las secuencias de aminoácidos especificadas basadas en los anticuerpos preferidos descritos en la presente descripción (p. ej., PTA021\_A1, PTA021\_A2 o PTA021\_A3), o las modificaciones conservativas de estos, y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-CADM1 de la invención. En consecuencia, se describe en la presente descripción un anticuerpo monoclonal aislado, o porción de unión a antígeno de este, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde:

la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de las sec. con núms. de ident.:7, 8, y 9, y modificaciones conservativas de estas;

la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:16, 17, y 18, y las modificaciones conservativas de estas; y

el anticuerpo se une al CADM1 humano con una  $EC_{50}$  de 1 nM o menos.

El anticuerpo, además, puede unirse a las células CHO transfectadas con CADM1 humano.

En un ejemplo, la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 4, 5 y 6 y las modificaciones conservativas de estas; y la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 13, 14 y 15 y las modificaciones conservativas de estas. En otro ejemplo, la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:1, 2, y 3, y las modificaciones conservativas de estas; y la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de las sec. con núms. de ident.:10, 11, y 12, y las modificaciones conservativas de estas.

En varios ejemplos, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

Como se usa en la presente descripción, el término "modificaciones conservativas de secuencias" pretende referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservativas incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Pueden introducirse modificaciones en un anticuerpo por técnicas estándar conocidas en la técnica, tales como mutagénesis de sitio dirigido y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservativas de los aminoácidos son en las que el residuo de aminoácidos se sustituye con un residuo de aminoácidos que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se definen en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo pueden sustituirse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el anticuerpo alterado puede probarse para la función conservada usando los ensayos funcionales descritos en la presente descripción.

La secuencia CDR1 de la cadena pesada de las sec. con núms. de ident.:1, 2, o 3 puede comprender una o más modificaciones conservativas de secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos; la secuencia CDR1 de la cadena ligera de las sec. con núms. de ident.: 10, 11, o 12 puede comprender una o más modificaciones conservativas de secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos; la secuencia CDR2 de la cadena pesada que se muestra en las sec. con núms. de ident.:4, 5, o 6 puede comprender una o más modificaciones conservativas de secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos; la secuencia CDR2 de la cadena ligera que se muestra en las sec. con núms. de ident.:13, 14, o 15 puede comprender una o más modificaciones conservativas de secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos; la secuencia CDR3 de la cadena pesada que se muestra en las sec. con núms. de ident.:7, 8, o 9 puede comprender una o más modificaciones conservativas de secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos; y/o la secuencia CD3 de la cadena ligera que se muestra en las sec. con núms. de ident.:16, 17, o 18 puede comprender una o más modificaciones conservativas de secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos.

Anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos anti-CADM1 de la invención

Otro ejemplo proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítipo en CADM1 humano que cualquiera de los anticuerpos monoclonales CADM1 de la invención (es decir, anticuerpos que tienen la capacidad de competir cruzado para la unión a CADM1 con cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la invención). En un ejemplo, el anticuerpo de referencia para estudios sobre la competencia cruzada de unión puede ser el anticuerpo monoclonal PTA021\_A1 (que tiene secuencias  $V_H$  y  $V_K$  como se muestra en las sec. con núms. de ident.:19 y 22, respectivamente), el anticuerpo monoclonal PTA021\_A2 (que tiene secuencias  $V_H$  y  $V_K$  como se muestra en las sec. con núms. de ident.:20 y 23 respectivamente), o el anticuerpo monoclonal PTA021\_A3 (que tiene secuencias  $V_H$  y  $V_K$  como se muestra en las sec. con núms. de ident.:21 y 24 respectivamente). Tales anticuerpos de competencia cruzada pueden identificarse basándose en su capacidad para competir de manera cruzada con PTA021\_A1, PTA021\_A2 o PTA021\_A3 en los ensayos estándar de unión a CADM1. Por ejemplo, puede usarse el análisis BIAcore, ensayos ELISA o citometría de flujo para demostrar competencia cruzada para la unión con los anticuerpos de la presente invención. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de, por ejemplo, PTA021\_A1, PTA021\_A2 o PTA021\_A3, a CADM1 humano demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con PTA021\_A1, PTA021\_A2 o PTA021\_A3 para la unión a CADM1 humano y unirse, por lo tanto, al mismo epítipo en el CADM1 humano como PTA021\_A1, PTA021\_A2 o PTA021\_A3. En un ejemplo, el anticuerpo que se une al mismo epítipo en el CADM1 humano como PTA021\_A1, PTA021\_A2 o PTA021\_A3 es un anticuerpo monoclonal humano. Estos anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse aislarse como se describe en los Ejemplos.

Anticuerpos modificados y diseñados por ingeniería genética

Un anticuerpo de la invención puede prepararse adicionalmente usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias  $V_H$  y/o  $V_L$  descritas en la presente descripción puede usarse como material de partida para diseñar por ingeniería genética un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas en comparación con el anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede diseñarse por ingeniería genética mediante la modificación de uno o más aminoácidos dentro de una o ambas regiones variables (es decir,  $V_H$  y/o  $V_L$ ), por ejemplo dentro de una o más regiones marco. Adicionalmente o alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse genéticamente mediante la modificación de residuos dentro de la(s) región(es) constante(s), por ejemplo, para alterar la(s) función(es) efectora(s) del anticuerpo.

En ciertas modalidades, el injerto de CDR puede usarse para diseñar genéticamente las regiones variables de anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos interactúan con los antígenos objetivos, predominantemente, a través de los residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de los anticuerpos específicos de origen natural mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo específico de origen natural injertado en las secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (ver, *p.ej.*, Riechmann, L. y otros, (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. y otros, (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. y otros, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; patente de los Estados Unidos núm. 5,225,539 de Winter, y las patentes de los Estados Unidos núms. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 de Queen y otros).

En consecuencia, otro ejemplo se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o su porción de unión al antígeno, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 1, 2 y 3, las sec. con núms. de ident.: 4, 5 y 6 y las sec. con núms. de ident.: 7, 8 y 9, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 10, 11 y 12, las sec. con núms. de ident.: 13, 14 y 15 y las sec. con núms. de ident.: 16, 17 y 18, respectivamente. Por lo tanto, tales anticuerpos contienen las secuencias CDR de  $V_H$  y  $V_K$  de los anticuerpos monoclonales PTA021\_A1, PTA021\_A2 o PTA021\_A3 aunque pueden contener diferentes secuencias marco de estos anticuerpos.

Tales secuencias marco pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas de ADN o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN germinal para los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humana pueden encontrarse en la base de datos de secuencias germinales humanas "VBase" (disponible en Internet en [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase)), así como en Kabat, E. A., y otros, (1991) *Sequences of proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, Publicación NIH núm. 91-3242; Tomlinson, I. M., y otros, (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox, J. P. L. y otros, (1994) "A Directory of Human Germ-line VH Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836. Como otro ejemplo, las secuencias de ADN germinal para genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humana pueden encontrarse en la base de datos del Genbank. Por ejemplo, las siguientes secuencias germinales de la cadena pesada encontradas en el HCo7 HuMAb de ratón están disponibles en los números de acceso del Genbank que se adjuntan: 1-69 (NG\_0010109, NT\_024637 y BC070333), 3-33 (NG\_0010109 y NT\_024637) y 3-7 (NG\_0010109 y NT\_024637). Como otro ejemplo, las siguientes secuencias germinales de la cadena pesada encontradas en el HCo12 HuMAb de ratón están disponibles en los números de acceso de Genbank que se adjuntan: 1-69 (NG\_0010109, NT\_024637 y BC070333), 5-51 (NG\_0010109 y NT\_024637) y 4-34 (NG\_0010109 y NT\_024637), 3-30,3 (CAJ556644) y 3-23 (AJ406678).

Las secuencias de proteínas de anticuerpos se comparan contra una base de datos de secuencias de proteínas compiladas usando uno de los métodos de búsqueda de similitud de secuencias denominado Gapped BLAST (Altschul y otros, (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402), que se conoce bien por los expertos en la técnica. BLAST es un algoritmo heurístico en el que una alineación estadísticamente significativa entre la secuencia de anticuerpos y la secuencia de base de datos es probable que contenga pares de segmentos con alta puntuación (HSP) de palabras alineadas. Los pares de segmentos cuyas puntuaciones no pueden mejorarse mediante la extensión o recorte se denominan *hit*. En resumen, las secuencias de nucleótidos de origen VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/1list2.php>) se traducen y se mantiene la región entre FR1 a FR3 y se incluye la región marco. Las secuencias de la base de datos tienen una longitud media de 98 residuos. Se eliminan las secuencias duplicadas que presentan coincidencias exactas en toda la longitud de la proteína. Una búsqueda BLAST para proteínas que usa el programa blastp con parámetros estándar predeterminados, excepto el filtro de complejidad baja, que se desactiva, y la matriz de sustitución de BLOSUM62, filtra para 5 primeros hits que producen coincidencias de secuencia. Las secuencias de nucleótidos se traducen en los seis marcos y el marco sin codones de parada en el segmento coincidente de la secuencia de la base de datos se considera el hit potencial. Esto se confirma a su vez utilizando el programa BLAST tblastx, que traduce la secuencia de anticuerpos en los seis marcos y compara esas traducciones con las secuencias de nucleótidos VBASE traducidas dinámicamente en los seis marcos.

Las identidades son coincidencias exactas de aminoácidos entre la secuencia de anticuerpos y la base de datos de proteínas en toda la longitud de la secuencia. Los positivos (identidades + sustitución coincidentes) no son idénticos, sino sustituciones de aminoácidos guiadas por la matriz de sustitución BLOSUM62. Si la secuencia de anticuerpos coincide con dos de las secuencias de la base de datos con la misma identidad, el hit con la mayoría de los positivos puede decidirse que sea el hit de la secuencia coincidente.

Las secuencias marco preferidas para el uso en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias marco usadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, *p. ej.*, similares a las secuencias marco de  $V_H$  2-05 (sec. con núm. de ident.:31) y/o las secuencias marco de  $V_K$  L15 (sec. con núm. de

ident.:34) usadas por los anticuerpos monoclonales preferidos de la invención. Las secuencias  $V_H$  CDR1, CDR2, y CDR3, y las secuencias  $V_K$  CDR1, CDR2, y CDR3, pueden injertarse en las regiones marco que tienen la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de la inmunoglobulina germinal del que se deriva la secuencia marco, o las secuencias CDR pueden injertarse en las regiones marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias germinales. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos es beneficioso mutar residuos dentro de las regiones marcos para mantener o potenciar la capacidad de unión del antígeno al anticuerpo (ver p. ej., las patentes de los Estados Unidos núms. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 de Queen y otros).

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar los residuos de aminoácidos dentro de las regiones  $V_H$  y/o  $V_K$  de CDR1, CDR2 y/o CDR3 para mejorar de este modo una o más propiedades de unión (p. ej., afinidad) del anticuerpo de interés. La mutagénesis dirigida o mutagénesis mediada por PCR puede realizarse para introducir la mutación o las mutaciones y el efecto sobre la unión del anticuerpo u otra propiedad funcional de interés puede evaluarse con los ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describe en la presente descripción y se proporciona en los Ejemplos. Preferentemente se introducen modificaciones conservativas (como se discutió anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos, pero son preferentemente sustituciones. Además, típicamente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR.

En consecuencia, en otro ejemplo, la presente descripción describe los anticuerpos monoclonales anti-CADM1 aislados, o sus porciones de unión al antígeno, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende: (a) una región CDR1 de  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 1, 2 y 3, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con las sec. con núms. de ident.: 1, 2 y 3; (b) una región CDR2 de  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 4, 5 y 6, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones en comparación con las sec. con núms. de ident.: 4, 5 y 6; (c) una región CDR3 de  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 7, 8 y 9, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos, en comparación con las sec. con núms. de ident.: 7, 8 y 9; (d) una región CDR1 de  $V_K$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 10, 11 y 12, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones en comparación con las sec. con núms. de ident.: 10, 11 y 12; (e) una región CDR2 de  $V_K$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 13, 14 y 15, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos, en comparación con las sec. con núms. de ident.: 13, 14 y 15; y (f) una región CDR3 de  $V_K$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 16, 17 y 18, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos, en comparación con las sec. con núms. de ident.: 16, 17 y 18.

Los anticuerpos diseñados por ingeniería genética de la invención incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones a los residuos del marco dentro de  $V_H$  y/o  $V_K$ , p. ej. para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, tales modificaciones del marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una aproximación es "retromutar" uno o más residuos del marco en la secuencia germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos del marco que difieren de la secuencia germinal a partir de la cual se deriva el anticuerpo. Tales residuos pueden identificarse comparando las secuencias marco del anticuerpo con las secuencias germinales de las que se deriva el anticuerpo. Por ejemplo, para PTA021\_A1, usando el sistema de numeración de Kabat, el residuo de aminoácido #30 (dentro de FR3) de  $V_H$  es una asparagina (sec. con núm. de ident.:19) mientras que este residuo en la secuencia germinal de  $V_H$  2-05 correspondiente es una serina (sec. con núm. de ident.:31). Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración germinal, las mutaciones somáticas pueden "retro-mutarse" a la secuencia germinal, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida o mutagénesis mediada por PCR (p. ej., el residuo #30 de  $V_H$  de PTA021\_A1 puede "retromutarse" de asparagina a serina).

Como otro ejemplo, para PTA021\_A1, el residuo de aminoácido #54 de  $V_H$  es un ácido aspártico (sec. con núm. de ident.:19) mientras que este residuo en la secuencia germinal de  $V_H$  2-05 correspondiente es una asparagina (sec. con núm. de ident.:31). Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración germinal, por ejemplo, el residuo #54 de  $V_H$  de PTA021\_A1 puede "retromutarse" de ácido aspártico a asparagina. Estos anticuerpos "retromutados" se pretenden abarcar, además, por la invención.

Como otro ejemplo, para PTA021\_A1, el residuo de aminoácido #50 de  $V_K$  es una glicina (sec. con núm. de ident.:22) mientras que este residuo en la secuencia germinal de  $V_K$  L15 correspondiente es una alanina (sec. con núm. de ident.:34). Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración germinal, por ejemplo, el residuo #50 de  $V_K$  de PTA021\_A1 puede "retromutarse" de glicina a alanina. Estos anticuerpos "retromutados" se pretenden abarcar, además, por la invención.

Como otro ejemplo, para PTA021\_A1, el residuo de aminoácido #77 de  $V_K$  es una asparagina (sec. con núm. de ident.:22) mientras que este residuo en la secuencia germinal de  $V_K$  L15 correspondiente es una serina (sec. con núm.

de ident.:34). Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración germinal, por ejemplo, el residuo #77 de V<sub>K</sub> de PTA021\_A1 puede "retromutarse" de asparagina a serina. Estos anticuerpos "retromutados" se pretenden abarcar, además, por la invención.

5 Como otro ejemplo, para PTA021\_A2, el residuo de aminoácido #54 de V<sub>H</sub> es un ácido aspártico (sec. con núm. de ident.:20) mientras que este residuo en la secuencia germinal de V<sub>H</sub> 2-05 correspondiente es una asparagina (sec. con núm. de ident.:32). Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración germinal, por ejemplo, el residuo #54 de V<sub>H</sub> de PTA021\_A2 puede "retromutarse" de ácido aspártico a asparagina. Estos anticuerpos "retromutados" se pretenden abarcar, además, por la invención.

10 Todavía, en otro ejemplo, para PTA021\_A2, el residuo de aminoácido #89 de V<sub>H</sub> es una isoleucina (sec. con núm. de ident.:20) mientras que este residuo en la secuencia germinal de V<sub>H</sub> 2-05 correspondiente es una treonina (sec. con núm. de ident.:32). Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración germinal, por ejemplo, el residuo #89 dentro de FR1 de V<sub>H</sub> de PTA021\_A2 puede "retromutarse" de isoleucina a treonina. Estos anticuerpos "retromutados" se pretenden abarcar, además, por la invención.

15 Como otro ejemplo, para PTA021\_A3, el residuo de aminoácido #54 de V<sub>H</sub> es un ácido aspártico (sec. con núm. de ident.:21) mientras que este residuo en la secuencia germinal de V<sub>H</sub> 2-05 correspondiente es una asparagina (sec. con núm. de ident.:33). Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración germinal, por ejemplo, el residuo #54 de V<sub>H</sub> de PTA021\_A3 puede "retromutarse" de ácido aspártico a asparagina. Estos anticuerpos "retromutados" se pretenden abarcar, además, por la invención.

20 Como otro ejemplo, para PTA021\_A3, el residuo de aminoácido #77 de V<sub>K</sub> es una asparagina (sec. con núm. de ident.:24) mientras que este residuo en la secuencia germinal de V<sub>K</sub> L15 correspondiente es una serina (sec. con núm. de ident.:36). Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración germinal, por ejemplo, el residuo #77 de V<sub>K</sub> de PTA021\_A1 puede "retromutarse" de asparagina a serina. Estos anticuerpos "retromutados" se pretenden abarcar, además, por la invención.

25 Otro tipo de modificación del marco implica la mutación de uno o más residuos dentro de la región marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar epítomos de células T que reducen, de ese modo, el potencial de inmunogenicidad del anticuerpo. Este enfoque se conoce, además, como "desinmunización" y se describe con más detalle en la publicación de patente de los Estados Unidos núm. 20030153043 por Carr y otros.

30 Adicionalmente o como alternativa de las modificaciones hechas dentro del marco, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse por ingeniería genética para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la vida útil sérica, la fijación de complemento, unión al receptor Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (*p. ej.*, una o más porciones químicas pueden unirse al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, para alterar de nuevo una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas modalidades se describe con más detalle más abajo. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice de la UE de Kabat.

35 En una modalidad, la región bisagra de CH1 se modifica de manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altera, *p. ej.*, se aumenta o disminuye. Este enfoque se describe además, en la patente de los Estados Unidos núm. 5,677,425 por Bodmer y otros. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el montaje de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

40 En otra modalidad, la región bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la vida útil biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra de Fc de manera que el anticuerpo tiene una unión deteriorada de la proteína A de estafilococo (SpA) con relación a la unión de SpA con el dominio bisagra de Fc nativa. Este enfoque se describe en detalles además en la patente de los Estados Unidos núm. 6,165,745 por Ward y otros.

45 En otra modalidad, el anticuerpo se modifica para aumentar su vida útil biológica. Diversos enfoques son posibles. Por ejemplo, pueden introducirse una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como descrito en la patente de los Estados Unidos núm. 6,277,375 por Ward. Alternativamente, para aumentar la vida útil biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o C<sub>L</sub> para contener un epítomo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,869,046 y 6,121,022 por Presta y otros.

50 En otra modalidad, el anticuerpo se produce como un UniBody® como se describe en el documento de patente WO/2007/059782.

55 En otras modalidades, la región Fc se altera reemplazando al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar la(s) función(es) efectora(s) del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos

seleccionados entre los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo tiene una afinidad alterada para un ligando efector pero conserva la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo progenitor. El ligando efector al que se le afecta la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con más detalle en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,624,821 y 5,648,260, ambas por Winter y otros.

En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados entre los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente, de manera que el anticuerpo tiene una unión de C1q alterada y/o reduce o suprime la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Este enfoque se describe con mayor detalle en la patente de los Estados Unidos núm. 6,194,551 por Idusogie y otros.

En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las posiciones de aminoácidos 231 y 239 se alteran para de este modo, alterar la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT del documento de patente WO 94/29351 por Bodmer y otros.

Aun en otro ejemplo, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo para un receptor Fcy modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Este enfoque se describe además en la publicación PCT del documento de patente WO 00/42072 por Presta. Además, se mapearon los sitios de unión en la IgG1 humana para FcyRI, FcyRII, FcyRIII y FcRn y se describieron variantes con unión mejorada (ver Shields, R.L. y otros, (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Se demostraron que las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la unión a FcyRIII. Además, se demostró que los siguientes mutantes de combinación mejoran la unión a FcyRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

Todavía en otra modalidad, la glicosilación de un anticuerpo se modifica. Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo sin glicosilar (es decir, el anticuerpo que carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que resultan en la eliminación de uno o más sitios de glicosilación del marco de la región variable para eliminar, de ese modo, la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por antígeno. Tal enfoque se describe más detalladamente en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,714,350 y 6,350,861 por Co y otros.

Adicionalmente, puede producirse un anticuerpo que tiene un tipo de glicosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene aumentadas las estructuras de GlcNac en bisectriz. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad ADCC de anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con la maquinaria de glicosilación alterada. Las células con la maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y pueden usarse como células huésped en las que se expresan los anticuerpos recombinantes de la invención para producir, de ese modo, un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 FUT8<sup>-/-</sup> se crearon mediante la disrupción dirigida del gen FUT8 en las células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazo (ver la publicación de patente de los Estados Unidos núm. 20040110704 por Yamane y otros, y Yamane-Ohnuki y otros (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Como otro ejemplo, el documento EP 1,176,195 de Hanai y otros, describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de manera que los anticuerpos expresados en dicha línea celular presentan hipofucosilación con reducción o eliminación de la enzima relacionada con el enlace alfa-1,6. Hanai y otros describen además, líneas celulares que tienen una baja actividad enzimática para añadir fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La publicación PCT del documento de patente WO 03/035835 por Presta describe una variante de la línea celular CHO, células Lec13, con capacidad reducida para enlazar la fucosa a los carbohidratos unidos a Asn(297), lo que resulta además, en la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula huésped (ver también Shields, R.L. y otros (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). La publicación PCT del documento de patente WO 99/54342 por Umana y otros, describe líneas celulares manipuladas para expresar glucosiltransferasas modificadoras de glucoproteínas (p. ej., beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas por ingeniería genética muestran estructuras aumentadas de GlcNac que se dividen en dos, lo que da como resultado una actividad ADCC aumentada de los anticuerpos (ver además Umana y otros (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Alternativamente, los residuos de fucosa del anticuerpo pueden escindirise usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina los residuos fucosilo de los anticuerpos (Tarentino, A.L. y otros (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Otra modificación de los anticuerpos que se contemplan en la presente invención es la pegilación. Un anticuerpo puede pegilarse, por ejemplo, para aumentar la vida útil biológica (*p. ej.*, suero) del anticuerpo. Para peguilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento de este, típicamente, se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, bajo condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Por ejemplo, la pegilación se lleva a cabo a través de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEGreactiva (o un polímero reactivo análogo soluble en agua). Como se usa en la presente descripción, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas modalidades, el anticuerpo que se pega es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para la pegilación de proteínas son conocidos en la técnica y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Ver por ejemplo, EP 0 154 316 por Nishimura y otros, y EP 0 401 384 por Ishikawa y otros.

#### Propiedades físicas de los anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse además, por las diversas propiedades físicas de los anticuerpos anti-CADM1. Pueden usarse diversos ensayos para detectar y/o diferenciar diferentes clases de anticuerpos basándose en estas propiedades físicas.

En algunas modalidades, los anticuerpos de la presente invención pueden contener uno o más sitios de glicosilación en la región variable de cadena ligera o pesada. La presencia de uno o más sitios de glicosilación en la región variable puede resultar en un aumento de la inmunogenicidad del anticuerpo o una alteración del pK del anticuerpo debido a la unión alterada del antígeno (Marshall y otros (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA y Morrison SL (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick y otros (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh y otros (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura y otros, (2000) *Mol Immunol* 37 :697 -706). Se ha sabido que la glicosilación se produce en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. La glicosilación de la región variable puede probarse usando un ensayo de Glycoblot, que escinde el anticuerpo para producir un Fab, y luego prueba la glicosilación usando un ensayo que mide la oxidación del peryodato y la formación de la base de Schiff. Alternativamente, la glicosilación de la región variable puede ensayarse usando cromatografía Dionex ligera (Dionex-LC), que corta los sacáridos de un Fab en monosacáridos y analiza el contenido del sacárido individual. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-CADM1 que no contenga glicosilación en la región variable. Esto puede conseguirse seleccionando anticuerpos que no contengan el motivo de glicosilación en la región variable o por mutación de residuos dentro del motivo de glicosilación usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica.

Como ejemplo de glicosilación, para PTA021\_A1, usando el sistema de numeración de Kabat, el residuo de aminoácido #30 (dentro de FR3) de V<sub>H</sub> es una asparagina (sec. con núm. de ident.:19). Este es un sitio de glicosilación potencial y este residuo puede mutarse a una glutamina.

En una modalidad preferida, los anticuerpos de la presente invención no contienen sitios isoméricos de asparagina. Un efecto de desamidación o ácido isoaspártico puede ocurrir en las secuencias N-G o D-G, respectivamente. El efecto de desamidación o ácido isoaspártico resulta en la creación del ácido isoaspártico que disminuye la estabilidad de un anticuerpo creando una estructura retorcida fuera de un extremo carboxi de la cadena lateral en lugar de la cadena principal. La creación del ácido isoaspártico puede medirse utilizando un ensayo iso-cuantitativo, que usa un HPLC con cromatografía de fase inversa para ensayar el ácido isoaspártico.

Cada anticuerpo tendrá un punto isoeléctrico único (pI), pero generalmente, los anticuerpos caerán en el intervalo de pH entre 6 y 9,5. El pI para un anticuerpo IgG1 cae, típicamente, dentro del intervalo de pH de 7-9,5 y el pI para un anticuerpo IgG4 cae, típicamente, dentro del intervalo de pH de 6-8. Los anticuerpos pueden tener un pI que está fuera de ese intervalo. Aunque los efectos son generalmente desconocidos, se especula que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal pueden tener algún desplegamiento e inestabilidad bajo condiciones *in vivo*. El punto isoeléctrico puede probarse usando un ensayo de isoelectroenfoco capilar, que crea un gradiente de pH y puede usar el enfoque láser para aumentar la precisión (Janini y otros (2002) *Electrophoresis* 23:1605-11; Ma y otros, (2001) *Chromatographia* 53:S75-89; Hunt y otros(1998) *J Chromatogr A* 800:355-67). En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-CADM1 que contiene un valor pI que cae en el intervalo normal. Esto puede conseguirse seleccionando anticuerpos con un pI en el intervalo normal o mediante la mutación de residuos superficiales cargados usando procedimientos estándar bien conocidos en la técnica.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión que es indicativa de la estabilidad térmica (Krishnamurthy R y Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Una mayor estabilidad térmica indica mayor estabilidad global del anticuerpo *in vivo*. El punto de fusión de un anticuerpo puede medirse usando técnicas tales como calorimetría diferencial de barrido (Chen y otros (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando y otros (1999) *Immunol Lett* 68:47-52). T<sub>M1</sub> indica la temperatura del desplegamiento inicial del anticuerpo. T<sub>M2</sub> indica la temperatura de desplegamiento completo del anticuerpo. Generalmente, se prefiere que la T<sub>M1</sub> de un anticuerpo de la presente invención sea mayor que 60°C, preferentemente mayor que 65°C, incluso con mayor preferencia mayor que 70°C. Alternativamente, la estabilidad térmica de un anticuerpo puede medirse usando difracción circular (Murray y otros, (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

En una modalidad preferida, se seleccionan anticuerpos que no se degradan rápidamente. La fragmentación de un anticuerpo anti-CADM1 puede medirse usando electroforesis capilar (CE) y MALDI-MS, como se entiende bien en la técnica (Alexander AJ y Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

- 5 En otra modalidad preferida, se seleccionan anticuerpos que tienen mínimos efectos de agregación. La agregación puede conducir al desencadenamiento de una respuesta inmune indeseada y/o propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. En general, los anticuerpos son aceptables con agregación de 25% o menos, preferentemente 20% o menos, incluso con mayor preferencia 15% o menos, incluso con mayor preferencia 10% o menos e incluso con mayor preferencia 5% o menos. La agregación puede medirse con diversas técnicas bien conocidas en la técnica, incluyendo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con columna de exclusión por tamaño (SEC) y dispersión de luz para identificar monómeros, dímeros, trímeros o multímeros.

#### Métodos de anticuerpos diseñados por ingeniería genética

- 15 Como se analizó anteriormente, los anticuerpos anti-CADM1 que tienen las secuencias  $V_H$  y  $V_K$  descritas en la presente descripción pueden usarse para crear nuevos anticuerpos anti-CADM1 modificando las secuencias  $V_H$  y/o  $V_K$ , o la(s) región(es) constante(s) unida(s) a ella(s). Así, en otro ejemplo, las características estructurales de un anticuerpo anti-CADM1 de la invención, p. ej. PTA021\_A1, PTA021\_A2, o PTA021\_A3, se usan para crear anticuerpos anti-CADM1 estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión al CADM1 humano. Por ejemplo, pueden combinarse una o más regiones CDR de PTA021\_A1, PTA021\_A2 o PTA021\_A3, o mutaciones de estas, pueden combinarse por vía recombinante con regiones marco conocidas y/u otras CDR para crear anticuerpos anti-CADM1 adicionales, diseñados por ingeniería genética por vía recombinante, como se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de ingeniería genética es una o más de las secuencias  $V_H$  y/o  $V_K$  proporcionadas en la presente descripción, o una o más regiones CDR de estas. Para crear el anticuerpo diseñado por ingeniería genética, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias  $V_H$  y/o  $V_K$  proporcionadas en la presente descripción, o una o más regiones CDR de estas. En cambio, la información contenida en la(s) secuencia(s) se usa como material de partida para crear una(s) secuencia(s) de "segunda generación" derivada(s) de la(s) secuencia(s) original(es) y después, se prepara la(s) secuencia(s) de "segunda generación" y se expresa como una proteína.

- En consecuencia, en otro ejemplo se proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-CADM1 que comprende: proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 1, 2 y 3, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 4, 5 y 6 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 7, 8 y 9; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 10, 11, y 12, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 13, 14 y 15, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las sec. con núms. de ident.: 16, 17 y 18; alterar al menos un residuo de aminoácido dentro de la secuencia del anticuerpo de región variable de la cadena pesada y/o la secuencia del anticuerpo de región variable de la cadena ligera para crear al menos una secuencia del anticuerpo alterada; y expresar la secuencia del anticuerpo alterada como una proteína.

- 45 Pueden usarse las técnicas de biología molecular estándar para preparar y expresar la secuencia del anticuerpo alterada.

- Preferentemente, el anticuerpo codificado por la(s) secuencia(s) del anticuerpo alterada(s) es uno que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-CADM1 descritos en la presente descripción, cuyas propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a:  
50 unirse a CADM1 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos;  
unirse a células CHO humanas transfectadas con CADM1.

- Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden evaluarse usando ensayos estándar disponibles en la técnica y/o descritos en la presente descripción, tales como los expuestos en los Ejemplos (p. ej., citometría de flujo, ensayos de unión).

- En ciertos ejemplos de los métodos de anticuerpos diseñados por ingeniería genética, las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente o selectivamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante del anticuerpo anti-CADM1 y los anticuerpos anti-CADM1 modificados resultantes pueden tamizarse para la actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe en la presente descripción. Se han descrito métodos mutacionales en la técnica. Por ejemplo, la publicación PCT del documento de patente WO 02/092780 por Short describe los métodos para crear y seleccionar mutaciones de anticuerpos usando mutagénesis de saturación, unidad de ligación sintética, o una combinación de estos. Alternativamente, la publicación PCT del documento de patente WO 03/074679 por Lazar y otros describe los métodos para usar los métodos de tamizaje computacional para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención

Otro aspecto de la invención se refiere a las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "presenta sustancialmente puro" cuando se purifica lejos de otros componentes celulares u otros contaminantes, p. ej., otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándar, incluyendo el tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en el arte. Ver, F. Ausubel, y otros, ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o no contener secuencias intrónicas. En una modalidad preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener usando técnicas estándar de biología molecular. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (p. ej., hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que portan genes de inmunoglobulina humana como se describe más abajo), los ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo producido por el hibridoma pueden obtenerse por técnicas estándar de amplificación por PCR o clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos a partir de una genoteca de inmunoglobulinas p. ej., usando técnicas de presentación de fagos), los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo pueden recuperarse de la genoteca.

Las moléculas de ácidos nucleicos preferidas de la invención son las que codifican las secuencias  $V_H$  y  $V_L$  de los anticuerpos monoclonales PTA021\_A1, PTA021\_A2, o PTA021\_A3. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias  $V_H$  de PTA021\_A1, PTA021\_A2, y PTA021\_A3 se muestran en las sec. con núms. de ident.: 25, 26, y 27, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias  $V_K$  de PTA021\_A1, PTA021\_A2, y PTA021\_A3 se muestran en las sec. con núms. de ident.: 28, 29, y 30, respectivamente.

Otros ácidos nucleicos descritos son los ácidos nucleicos que tienen al menos un 80% de identidad de secuencia, tal como al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia, con una de las secuencias mostradas en las sec. con núms. de ident.: 25, 26, 27, 28, 29, y 30, cuyos ácidos nucleicos codifican un anticuerpo de la invención, o una porción de unión al antígeno de este.

El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es el número de posiciones idénticas en la secuencia en la que el nucleótido es idéntico, teniendo en cuenta el número de interrupciones, y la longitud de cada interrupción, que se necesitan introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático, tal como el algoritmo de Meyers y Miller o el programa XBLAST de Altschul descrito anteriormente.

Además, los ejemplos de ácidos nucleicos descritos en la presente invención comprenden una o más porciones que codifican CDR de las secuencias de ácido nucleico mostradas en las sec. con núms. de ident.: 25, 26, 27, 28, 29 y 30. En este ejemplo, el ácido nucleico puede codificar la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena pesada de PTA021\_A1, PTA021\_A2 o PTA021\_A3 o la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena ligera de PTA021\_A1, PTA021\_A2 o PTA021\_A3.

Los ácidos nucleicos que tienen al menos un 80%, tal como al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia, con dicha porción codificante de CDR de sec. con núms. de ident.: 25, 26, 27, 28, 29, o 30 (secuencias  $V_H$  y  $V_K$ ) se describen también. Dichos ácidos nucleicos pueden diferir de la porción correspondiente de las sec. con núms. de ident.: 25, 26, 27, 28, 29, o 30 en una región no codificante de CDR y/o en una región codificante de CDR. Cuando la diferencia está en una región codificante de CDR, la región CDR codificada por el ácido nucleico típicamente comprende una o más modificaciones conservativas de secuencia como se definen en la presente descripción en comparación con la secuencia CDR correspondiente a PTA021\_A1, PTA021\_A2 o PTA021\_A3.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos  $V_H$  y  $V_K$ , estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo para convertir los genes de región variable en genes de la cadena completa del anticuerpo, en genes del fragmento Fab o un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica  $V_K$ - o  $V_H$  está operativamente enlazado a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante del anticuerpo o un ligando flexible. El término "operativamente enlazado", tal como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco.

El ADN aislado que codifica la región  $V_H$  puede convertirse en un gen de la cadena pesada completa, operativamente mediante el enlace del ADN que codifica  $V_H$  a otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana se conocen en la técnica (ver p. ej., Kabat, E. A., y otros (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, publicación NIH núm. 91-3242) y

fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante la amplificación por PCR estándar. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero con preferencia superlativa es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de fragmento Fab de la cadena pesada, el ADN que codifica  $V_H$  puede estar operativamente enlazado a otra molécula de ADN que codifica sólo la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región  $V_L / V_K$  puede convertirse en un gen de cadena ligera completa (así como en un gen Fab de cadena ligera) operativamente mediante el enlace del ADN que codifica  $V_L$  a otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana se conocen en la técnica (ver p. ej., Kabat, E. A., y otros, (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los Estados Unidos, publicación NIH núm. 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante la amplificación por PCR estándar. En modalidades preferidas, la región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican para  $V_H$  y  $V_L / V_K$  están unidos operativamente a otro fragmento que codifica un ligando flexible, p. ej., que codifica la secuencia de aminoácidos  $(Gly_4 - Ser)_3$ , de manera que las secuencias  $V_H$  y  $V_L / V_K$  pueden expresarse como una proteína de cadena única contigua, con las regiones  $V_L / V_K$  y  $V_H$  unidas por el ligando flexible (ver p. ej., Bird y otros (1988) *Science* 242:423-426; Huston y otros (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty y otros, (1990) *Nature* 348:552-554).

#### Producción de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (mAb) de la presente invención pueden producirse mediante una variedad de técnicas, incluyendo la metodología convencional de anticuerpos monoclonales p. ej., la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales p. ej., la transformación viral u oncogénica de los linfocitos B.

El sistema animal preferido para la preparación de hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión se conocen en la técnica. Los pares de fusión (p. ej., las células de mieloma murino) y procedimientos de fusión se conocen también.

Pueden prepararse anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención basados en la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado como se describió anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de la cadena pesada y ligera puede obtenerse a partir del hibridoma no humano de interés y diseñarse por ingeniería genética para contener secuencias de inmunoglobulinas no murinas (p. ej., humanas) usando técnicas convencionales de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden enlazarse a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (ver p. ej., la patente de los Estados Unidos núm. 4,816,567 por Cabilly y otros). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones de CDR murina pueden insertarse en un fragmento marco humano usando métodos conocidos en la técnica (ver p. ej., la patente de los Estados Unidos núm. 5,225,539 por Winter, y las patentes de los Estados Unidos núms. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 por Queen y otros).

En una modalidad preferida, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos. Estos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CADM1 pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones a los que se hace referencia en la presente descripción como ratones de las cepas HuMAb Mouse<sup>®</sup> y KM Mouse<sup>®</sup>, respectivamente, y se denominan colectivamente en la presente descripción como "ratones Ig humanos".

La cepa HuMAb Mouse<sup>®</sup> (Medarex<sup>®</sup>, Inc.) contiene los miniloci del gen de la inmunoglobulina humana que codifican las secuencias de inmunoglobulinas humanas de la cadena pesada ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y de la cadena ligera  $\kappa$  sin reordenar, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de la cadena  $\mu$  y  $\kappa$  endógena (ver p. ej., Lonberg, y otros, (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). En consecuencia, los ratones exhiben una expresión reducida de IgM o  $\kappa$  de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos experimentan conmutación de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgGk humanos de alta afinidad (Lonberg, N. y otros (1994), *arriba*; revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y el uso de HuMAb Mouse<sup>®</sup>, y las modificaciones genómicas llevadas a cabo en dichos ratones, se describen además en Taylor, L. y otros, (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. y otros, (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaille y otros, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi y otros, (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. y otros, (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaille y otros (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. y otros, (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild, D. y otros, (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Ver además, las patentes de Estados Unidos núms. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; y 5,770,429; todas de

Lonberg y Kay; lapatente de Estados Unidos núm. 5,545,807 de Surani y otros, las publicaciones PCT de documentos de patentes núms. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas de Lonberg y Kay; y la publicación PCT de documento de patente núm. WO 01/14424 de Korman y otros.

5 En otra modalidad, los anticuerpos humanos de la invención pueden levantarse usando un ratón que porta las secuencias de la inmunoglobulina humana en los transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que porta un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Este ratón se denomina en la presente descripción como un ratón de la cepa "ratón KM<sup>®</sup>" y se describe con detalle en la publicación PCT del documento de patente WO 02/43478 de Ishida y otros.

10 Más aún, los sistemas transgénicos alternativos de animales que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden usarse para levantar los anticuerpos anti-CADM1 de la invención. Por ejemplo, un sistema transgénico alternativo referido como el Xenorotón (Amgen, Inc.) puede usarse; dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 y 6,162,963 por Kucherlapati y otros.

15 Además, los sistemas transgénicos alternativos de animales que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden usarse para levantar los anticuerpos anti-CADM1 de la invención. Por ejemplo, pueden usarse los ratones que portan tanto un transcromosoma de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana, referido como "ratón TC"; tales ratones se describen en Tomizuka y otros, (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, se han descrito en la técnica las vacas que portan transcromosomas de cadenas pesada y ligera humanas (Kuroiwa y otros, (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) y la solicitud PCT del documento de patente núm. WO/2002/092812 y pueden usarse para elevar anticuerpos anti-CADM1 de la invención.

20 Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden prepararse además, usando métodos de presentación en fagos para tamizar genotecas de inmunoglobulina humana. En la técnica se establecen tales métodos de presentación en fagos para aislar los anticuerpos humanos. Ver por ejemplo: las patentes de los Estados Unidos núms. 5,223,409; 5,403,484; y 5,571,698 de Ladner y otros; las patentes de los Estados Unidos núms. 5,427,908 y 5,580,717 de Dower y otros; las patentes de los Estados Unidos núms. 5,969,108 y 6,172,197 de McCafferty y otros, y las patentes de los Estados Unidos núms. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 y 6,593,081 de Griffiths y otros.

25 Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden prepararse además, usando ratones SCID en los que se han reconstituido las células inmunes humanas de manera que se puede generar una respuesta de anticuerpo humano tras la inmunización. Estos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,476,996 y 5,698,767 de Wilson y otros.

#### Inmunización de ratones con Ig humana

30 Cuando se usan ratones con Ig humana para levantar anticuerpos humanos de la invención, tales ratones pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno CADM1 y/o CADM1 recombinante, o células que expresan CADM1, o una proteína de fusión CADM1, como descrito por Lonberg, N. y otros, (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. y otros, (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; y la publicación PCT del documento de patente núm. WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferentemente, los ratones tendrán de 6-16 semanas de edad en la primera infusión. Por ejemplo, puede usarse una preparación purificada o recombinante (5-50 µg) del antígeno CADM1 para inmunizar intraperitonealmente a los ratones con Ig humana.

35 Los procedimientos detallados para generar los anticuerpos monoclonales completamente humanos contra CADM1 se describen en el Ejemplo 1 más abajo. La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos responden cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (IP) con el antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido por inmunización IP cada dos semanas (hasta un total de 6) con el antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, se ha encontrado además, que los adyuvantes distintos de Freund son eficaces. Además, las células enteras en ausencia de adyuvante se ha encontrado que son altamente inmunogénicas. La respuesta inmunitaria puede monitorizarse en el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen por sangrados retroorbitales. El plasma puede tamizarse mediante ELISA (como se describe más abajo), y los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina anti-CADM1 humana pueden usarse para las fusiones. Los ratones pueden reforzarse por vía intravenosa con el antígeno 3 días antes del sacrificio y la eliminación del bazo. Se espera que por cada inmunización puedan ser necesarias realizar 2-3 fusiones. Para cada antígeno se inmunizan típicamente entre 6 y 24 ratones. En una modalidad, se pueden usar cepas de ratón que portan cepas de transgenes de la cadena pesada humana HCo7, HCo12 o HCo17. Alternativamente o adicionalmente, puede usarse la cepa KM ratón<sup>®</sup>. Además, dos o más de estas cepas pueden cultivarse juntas en un único ratón que tiene una pluralidad de diferentes transgenes de cadena pesada humana.

#### Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos

65 Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención, pueden aislarse los esplenocitos y/o las células de nodos linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse a una línea celular inmortalizada

apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden ser rastreados para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, las suspensiones de células únicas de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados pueden fusionarse a una sexta parte del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con 50% de PEG. Alternativamente, la suspensión de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados puede fusionarse usando un método de electrofusión basado en campo eléctrico, usando un electroporador de fusión de células de cámara grande CytoPulse (CytoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie, Maryland). Las células se sembraron a aproximadamente  $2 \times 10^5$  en la placa de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contenía 20% de suero clonal fetal, 18% de medio condicionado "653", 5% de origen (IGEN), 4mM de L-Glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomycin, 50 mg/ml de gentamicina y HAT 1X (Sigma, el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en un medio en el que el HAT se reemplaza con HT. Los pocillos individuales pueden entonces examinarse por ELISA para anticuerpos IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez que se produce un crecimiento extenso del hibridoma, el medio puede observarse usualmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan el anticuerpo pueden replantarse, tamizarse de nuevo, y si todavía son positivos para la IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables pueden después cultivarse *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para su caracterización.

Para purificar los anticuerpos monoclonales humanos, pueden cultivarse los hibridomas seleccionados en frascos giratorios de dos litros para la purificación del anticuerpo monoclonal. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey). Las IgG eluidas pueden verificarse mediante la electroforesis en gel y la cromatografía líquida de alta resolución para asegurar la pureza. La solución tampón puede intercambiarse con PBS, y la concentración puede determinarse mediante OD280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### Generación de Transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la invención pueden producirse también, en un transfectoma de células huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como se conoce bien en la técnica (p. ej., Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos de estos, los ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas completas o parciales pueden obtenerse mediante técnicas convencionales de biología molecular (p. ej., amplificación por PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que exprese el anticuerpo de interés) y los ADN pueden insertarse en vectores de expresión de manera que los genes están operativamente enlazados a las secuencias de control transcripcional y traduccional. En este contexto, el término "operativamente enlazado" pretende significar que un gen de anticuerpo se liga en un vector de manera que las secuencias de control transcripcional y de traducción dentro del vector sirvan para su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen del anticuerpo. Las secuencias de vector de expresión y control de expresión se eligen para ser compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de la cadena ligera del anticuerpo y el gen de la cadena pesada del anticuerpo pueden insertarse en un vector separado o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar (p. ej., ligación de los sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen de anticuerpo y el vector, o ligación de extremo romo si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de la cadena pesada y ligera de anticuerpos descritos en la presente descripción pueden usarse para crear genes de anticuerpos completos de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en los vectores de expresión que ya codifican las regiones constante de la cadena pesada y constante de la cadena ligera del isotipo deseado de manera que el segmento  $V_H$  se enlaza operativamente al(os) segmento(s)  $C_H$  dentro del vector y el segmento  $V_K$  se enlaza operativamente al segmento  $C_L$  dentro del vector. Adicionalmente o alternativamente, el vector de expresión puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo o región de unión al antígeno de una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de manera que el péptido señal se enlaza en marco del amino terminal del gen de la cadena del anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena de anticuerpos, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (p. ej., señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena del anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en las células huésped de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en las células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores

derivados de citomegalovirus (CMV), virus Simian 40 (SV40), adenovirus (p. ej., el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y el poliovirus. Alternativamente, pueden usarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la  $\beta$ -globina. Además, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SR $\alpha$ , que contiene secuencias del promotor temprano SV40 y la repetición terminal larga del virus de la leucemia de células T humanas tipo 1 (Takebe, Y. y otros (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

Además de los ácidos nucleicos del anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como las secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (p. ej., orígenes de la replicación) y genes de marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en las que el vector se introdujo (ver, p. ej., las patentes de Estados Unidos núms. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017, todas de Axel y otros). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que el vector se introdujo. Los genes marcadores seleccionables ilustrativos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para su uso en las células huésped-dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección de G418).

En algunas modalidades, para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, el(os) vector(es) de expresión que codifica(n) las cadenas pesadas y ligeras se transfecta(n) en una célula huésped mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción del ADN exógeno en una célula huésped procarionota o eucariota, p. ej., electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección dextrano-DEAE y similares. A pesar de que teóricamente es posible expresarlos anticuerpos de la invención ya sea en las células huésped procarionotas o eucariotas, la expresión de los anticuerpos en las células eucariotas y con preferencia superlativa en las células huésped de mamíferos, es la más preferida, debido a que tales células eucariotas, y en particular las células de mamíferos, son más propensas que las células procarionotas de ensamblar y secretar un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo. Se ha informado que la expresión procarionota de genes de anticuerpo es ineficaz para la producción de altos rendimientos de anticuerpo activo (Boss, M. A. y Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen Ovario de Hámster Chino (células CHO) (que incluyen las células dhfr<sup>-</sup> CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, usado con un marcador seleccionable DHFR, p. ej., como descrito en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Particularmente, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS descrito en el documento de patente núm. WO 87/04462 (de Wilson), WO 89/01036 (de Bebbington) y EP 338,841 (de Bebbington). Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican los genes de los anticuerpos se introducen en las células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, con mayor preferencia, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos estándar de purificación de proteínas.

#### Caracterización de la unión del anticuerpo al antígeno

Los anticuerpos de la invención pueden ensayarse para la unión a CADM1 mediante, por ejemplo, un ELISA estándar. En resumen, las microplacas se recubren con CADM1 purificado a 0,25  $\mu$ g/ml in PBS, y se bloquea después, con seroalbúmina bovina al 5% en PBS. Se añaden diluciones de anticuerpos (p. ej., diluciones de plasma de ratones inmunizados con CADM1) a cada pocillo y se incuban durante 1-2 horas a 37°C. Las placas se lavan con PBS/Tween y después se incuban con el reactivo secundario (p. ej., para anticuerpos humanos, un reactivo IgG de cabra anti-humano policlonal específico de Fc) conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C. Después del lavado, las placas se desarrollan con sustrato de pNPP (1 mg/ml), y se analizan a DO de 405-650. Preferentemente, los ratones que desarrollan los títulos más altos se usarán para fusiones.

Puede usarse también un ensayo ELISA como se describió anteriormente para tamizar los hibridomas que muestran reactividad positiva con el inmunógeno CADM1. Los hibridomas que se unen con gran avidéz a CADM1 se subclonan y se caracterizan adicionalmente. Puede elegirse un clon de cada hibridoma, que retiene la reactividad de las células parentales (por ELISA), para preparar un banco de células de 5-10 frascos almacenado a -140°C, y para la purificación del anticuerpo.

Para purificar los anticuerpos anti-CADM1, pueden cultivarse los hibridomas seleccionados en frascos giratorios de dos litros para la purificación de los anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey). Las IgG eluidas pueden verificarse mediante la electroforesis en gel y la cromatografía líquida de alta resolución para asegurar la pureza. La solución tampón puede intercambiarse con PBS, y la concentración puede determinarse mediante OD280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -80°C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-CADM1 seleccionados se unen a epítomos únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, Illinois). Los estudios para competir por la unión con los anticuerpos de la invención usando anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados pueden realizarse usando las placas ELISA recubiertas con CADM1 como se describió anteriormente. La unión de mAb biotinilado puede detectarse con una sonda de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, los isotipos ELISA pueden realizarse usando reactivos específicos para los anticuerpos de un isotipo en particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, los pocillos de las placas de microtitulación pueden recubrirse con 1 µg/ml de inmunoglobulina antihumana durante la noche a 4°C. Después de bloquear con BSA al 1%, las placas se ponen a reaccionar con 1 µg/ml o menos de anticuerpos monoclonales de prueba o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante una a dos horas. Los pocillos pueden entonces ponerse a reaccionar ya sea con sondas conjugadas con fosfatasa alcalina específicas de IgG1 humana o IgM humana. Se desarrollan y analizan placas como se describió anteriormente.

Las IgG humanas anti-CADM1 pueden ensayarse adicionalmente con respecto a la reactividad con el antígeno CADM1 mediante transferencia de membranas de tipo Western. En resumen, CADM1 puede prepararse y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida de dodecil sulfato de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ternero fetal al 10% y se sondean con los anticuerpos monoclonales a probar. La unión de IgG humana puede detectarse usando la IgG anti-humana fosfatasa alcalinay se desarrolló con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Missouri).

La especificidad de unión de un anticuerpo de la invención puede determinarse además, mediante el monitoreo de la unión del anticuerpo a las células que expresan CADM1, por ejemplo por citometría de flujo. Típicamente, una línea celular, tal como una línea celular CHO, puede transfectarse con un vector de expresión que codifica una forma transmembrana de CADM1. En algunas modalidades, la molécula CADM1 completa con una etiqueta HA amino terminal)sec. con núm. de ident.:43) se expresa en la superficie de la línea celular CHO. La proteína transfectada puede comprender una etiqueta, tal como una etiqueta myc, preferentemente en el N terminal, para la detección usando un anticuerpo para la etiqueta. La unión de un anticuerpo de la invención a CADM1 puede determinarse incubando las células transfectadas con el anticuerpo y detectando el anticuerpo unido. La unión de un anticuerpo a la etiqueta sobre la proteína transfectada puede usarse como un control positivo.

La especificidad de un anticuerpo de la invención para CADM1 puede estudiarse adicionalmente determinando si el anticuerpo se une o no a otras proteínas, tales como TSL2/CADM1C u otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas usando los mismos métodos mediante los cuales se determina la unión a CADM1.

Conjugados anticuerpo-molécula asociada

En un aspecto preferido, se proporciona un conjugado que comprende un anticuerpo anti-CADM1 de conformidad con esta invención y una molécula asociada, estando representado el conjugado por la fórmula (a)



donde Z es un anticuerpo de conformidad con esta invención; D es una molécula asociada; y  $(X^Z)_aC(X^D)_b$  se denominan colectivamente como una "porción de enlace" o "ligando" porque enlazan los dos primeros elementos. Dentro del ligando, C es un grupo escindible diseñado para que se escinda en el sitio de acción biológica pretendido de la molécula D asociada;  $X^Z$  y  $X^D$  se denominan porciones espaciadoras (o "espaciadores") porque separan Z y C y C y D, respectivamente; los subíndices a y b son independientemente 0 o 1 (es decir, la presencia de  $X^Z$  y/o  $X^D$  es opcional); y el subíndice m es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 (preferentemente 1, 2, 3, o 4). Cada uno de los términos anteriores se define más completamente en la presente descripción más abajo.

El anticuerpo Z sirve una función de orientación: uniéndose a un tejido o célula objetivo donde se localiza su antígeno, dirige el conjugado allí. Preferentemente, el tejido o célula objetivo es un tumor o una célula cancerosa y el antígeno es un antígeno asociado a tumor o específico de tumor. La escisión del grupo C en el tejido o célula objetivo libera la molécula D asociada para realizar su función biológica prevista. En algunos ejemplos, el conjugado se internaliza en una célula objetivo por endocitosis y la escisión tiene lugar dentro de la célula objetivo. De esta manera, se logra el suministro preciso de la molécula D asociada en el sitio de acción, reduciendo la dosificación necesaria. Además, la molécula D asociada es normalmente biológicamente inactiva (o significativamente menos activa) en su estado conjugado, reduciendo de este modo, la toxicidad no deseada frente a los tejidos o células no objetivo. Dado que los fármacos contra el cáncer son frecuentemente compuestos altamente tóxicos con un bajo índice terapéutico, esta es una consideración importante.

Como se refleja por el subíndice m, cada molécula del anticuerpo Z puede conjugarse con más de una molécula D asociada, dependiendo del número de sitios que el primero tiene disponibles para la conjugación y de las condiciones experimentales empleadas. Los expertos en la técnica apreciarán que, mientras que cada molécula del anticuerpo Z se conjuga con un número entero de moléculas asociadas D, una preparación del conjugado puede analizarse en una relación no entera de las moléculas asociadas D para el anticuerpo Z, lo que refleja un promedio estadístico.

Anticuerpo Z

Cualquiera de varios grupos reactivos diferentes sobre el anticuerpo Z puede usarse como un sitio de conjugación, incluyendo los grupos  $\epsilon$ -amino en los residuos lisina, porciones carbohidrato colgantes, grupos de ácido carboxílico, grupos disulfuro y grupos tiol. Cada tipo de grupo reactivo representa un intercambio, con algunas ventajas pero algunas limitaciones compensatorias. Para revisiones de los grupos reactivos de los anticuerpos adecuados para la conjugación, ver, p. ej., Garnett, *Adv. Drug Delivery Rev.* 53 (2001), 171-216 y Dubowchik y Walker, *Pharmacology & Therapeutics* 83 (1999), 67-123.

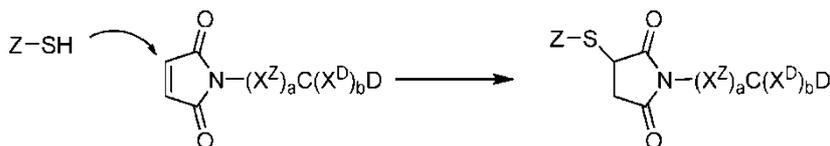
En una modalidad, el anticuerpo Z se conjuga a través de un grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina. La mayoría de los anticuerpos tienen múltiples grupos  $\epsilon$ -amino de lisina expuestos, que pueden conjugarse mediante enlaces amida, urea, tiourea o carbamato usando técnicas conocidas en la técnica, incluyendo la modificación con un agente heterobifuncional (como se describe adicionalmente en la presente descripción más abajo). Sin embargo, es difícil controlar qué y cuántos grupos  $\epsilon$ -amino reaccionan, dando lugar a una variabilidad potencial de lote a lote en las preparaciones conjugadas. Además, la conjugación puede causar la neutralización de un grupo  $\epsilon$ -amino protonado importante para mantener la conformación nativa del anticuerpo o puede tener lugar en una lisina cerca o en el sitio de unión al antígeno, sin ser una ocurrencia deseable.

En otra modalidad, el anticuerpo Z puede conjugarse a través de una cadena lateral del carbohidrato, ya que muchos anticuerpos están glicosilados. La cadena lateral de carbohidratos puede oxidarse con peryodato para generar grupos aldehído, que a su vez pueden reaccionar con aminas para formar un grupo imina, tal como en una semicarbazona, oxima o hidrazona. Si se desea, el grupo imina puede reducirse con cianoborohidruro de sodio para producir un enlace más estable. Para obtener información adicional sobre la conjugación a través de las cadenas laterales de carbohidratos, ver, p. ej., Rodwell y otros, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83, 2632-2636 (1986). Al igual que con los grupos  $\epsilon$ -amino de lisina, existen preocupaciones con respecto a la localización del (de los) sitio(s) de conjugación y estequiometría.

Todavía en otra modalidad, el anticuerpo Z puede conjugarse a través de un grupo de ácido carboxílico. En una modalidad, un grupo de ácido carboxílico terminal es funcionalizado para generar una carbohidrazida, que después se pone a reaccionar con una porción de conjugación que porta el aldehído. Ver Fisch y otros, *Bioconjugate Chemistry* 1992, 3, 147-153.

Todavía en otra modalidad, el anticuerpo Z puede conjugarse a través de un grupo disulfuro que forma puentes con el azufre de un residuo de cisteína sobre el anticuerpo Z y un azufre sobre la otra porción del conjugado. Algunos anticuerpos (tales como el isotipo IgG) carecen de grupos tiol libres pero tienen grupos disulfuro, por ejemplo en la región bisagra. En tal caso, se pueden generar grupos tiol libres por reducción de grupos disulfuro nativos. Los grupos tiol generados así, pueden usarse también para la conjugación. Ver, por ejemplo, Packard y otros, *Biochemistry* 1986, 25, 3548-3552; King y otros, *Cancer Res.* 54, 6176-6185 (1994); y Doronina y otros, *Nature Biotechnol.* 21(7), 778-784 (2003). Nuevamente, existen preocupaciones con respecto a la ubicación de la conjugación y la estequiometría y la posible ruptura de la conformación nativa del anticuerpo.

Todavía en otra modalidad preferida, el anticuerpo Z se conjuga a través del producto de adición nucleofílica de un grupo tiol a una porción aceptora. Una porción aceptora preferida es un grupo maleimida, cuya reacción con un grupo tiol del anticuerpo se ilustra más abajo:



Se han desarrollado varios métodos para introducir grupos tioles libres en los anticuerpos sin romper los enlaces disulfuro nativos, métodos que pueden practicarse con un anticuerpo Z de esta invención. Dependiendo del método empleado, puede ser posible introducir un número predecible de sulfidrilos libres en ubicaciones específicas. En un enfoque, se preparan los anticuerpos mutados en los que una cisteína se sustituye por otro aminoácido. Ver, por ejemplo, Eigenbrot y otros, US 2007/0092940 A1; Chilkoti y otros, *Bioconjugate Chem.* 1994, 5, 504-507; Urmovitz y otros, US 4,698,420 (1987); Stimmel y otros, *J. Biol. Chem.*, 275 (39), 30445-30450 (2000); Bam y otros, US 7,311,902 B2 (2007); Kuan y otros, *J. Biol. Chem.*, 269 (10), 7610-7618 (1994); Poon y otros, *J. Biol. Chem.*, 270 (15), 8571-8577 (1995). En otro enfoque, se añade una cisteína extra al extremo C-terminal. Ver, p. ej. Cumber y otros, *J. Immunol.*, 149, 120-126 (1992); King y otros, *Cancer Res.*, 54, 6176-6185 (1994); Li y otros, *Bioconjugate Chem.*, 13, 985-995 (2002); Yang y otros, *Protein Engineering*, 16, 761-770 (2003); y Olafson y otros, *Protein Engineering Design & Selection*, 17, 21-27 (2004). Un método preferido para introducir cisteínas libres es el descrito por King, en la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. de serie 60/957,271, presentado el 22 de agosto de 2007, en la que se añade una secuencia de aminoácidos que porta una cisteína en el C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo. Este

método introduce un número conocido de residuos de cisteína (uno por cadena pesada) en una locación conocida alejada del sitio de unión al antígeno.

5 Aún en otra modalidad, los grupos  $\epsilon$ -amino de lisina pueden modificarse con reactivos heterobifuncionales tales como 2-iminotiolano o N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), convirtiendo un grupo  $\epsilon$ -amino en un grupo tiol o grupo disulfuro - creando un sustituto de cisteína, como si lo fuera. Sin embargo, este método sufre la misma localización de la conjugación y las limitaciones de estequiometría asociadas con los grupos  $\epsilon$ -amino apropiados.

10 Molécula D asociada

10 La molécula D asociada puede ser un agente terapéutico o un marcador. Si es el primero, puede ser, por ejemplo, una citotoxina, un fármaco nocitotóxico (p. ej., un inmunosupresor), un agente radioactivo, otro anticuerpo, o una enzima, o su fragmento activo, tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica; una proteína tales como factor de necrosis tumoral o interferón- $\gamma$ ; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina 2 ("IL-2"), interleuquina 6 ("IL-6"), factor de estimulación de colonias de macrófagos granulocitos ("GM-CSF"), factor de estimulación de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento. Si es el último, puede ser cualquier porción que genere una señal detectable, tales como un marcador radiactivo, un marcador fluorescente o una enzima que cataliza una modificación detectable por un sustrato. Ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso en el diagnóstico o terapia incluyen, pero no se limitan a, yodo<sup>131</sup>, indio<sup>111</sup>, itrio<sup>90</sup> y lutecio. Los métodos para preparar los radioinmunoconjugados se establecen en la técnica. Los ejemplos de radioinmunoconjugados están disponibles en el comercio, que incluyen Zevalin® (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals), y pueden usarse métodos similares para preparar radioinmunoconjugados utilizando los anticuerpos de la invención.

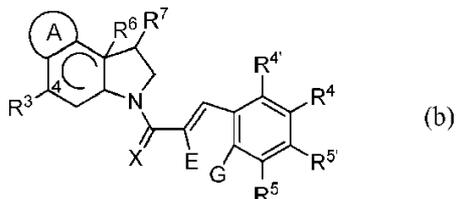
25 Las citotoxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que sea perjudicial a (p. ej., mata) las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y sus análogos u homólogos.

30 Cuando la molécula D asociada es un agente terapéutico, las clases adecuadas de agentes terapéuticos incluyen antimetabolitos, agentes alquilantes, aglutinantes de ranura menor de ADN, intercaladores de ADN, reticulantes de ADN, inhibidores de histona desacetilasa, inhibidores de exportación nuclear, inhibidores de proteosoma, inhibidores de topoisomerasa I o II, inhibidores de proteínas de choque térmico, inhibidores de tirosina quinasa, antibióticos y agentes antimetabólicos. Ejemplos de agentes terapéuticos adecuados incluyen actinomicina D, antraciclinas, antramycin (AMC), auristatina, bleomicina, busulfán, caliceamicina, camptotecina, carmustina, clorambucilo, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP), cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, citochalasina B, dactinomicina, daunorubicina, decarbazina, 1-deshidrotestosterona, dibromomanitol, dihidroxiantracindiona, doxorubicina, emetina, epotilona, bromuro de etidio, etopósido, 5-fluorouracilo, gemcitabina, glucocorticoides, gramicidina D, imatinib, irinotecán,  $\beta$ -lapachona, lidocaína, lomustina, maytansina, mecloretamina, melfalano, 6-mercaptapurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, paclitaxel, procaína, propranolol, puromicina, ricina, estreptoizotocina, ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA), talisomicina, tenoposida, tetracaína, tioepa, 6-tioguanina, tubulisina, vinblastina, vincristina, y análogos, homólogos o derivados de estos.

45 Preferentemente, la molécula D asociada es una citotoxina seleccionada del grupo que consiste en auristatinas (especialmente MMAE y MMAF), antibióticos enediina (especialmente caliceamicina y CalichDMH), doxorubicina, maytansinoides (especialmente DM1 y DM4), exotoxina A de *Pseudomonas*, (especialmente su forma truncada), alquilantes de unión de ranura menor de ADN (especialmente CC-1065 y análogos de duocarmicina), y análogos o derivados de estos. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de caliceamicina está disponible en el comercio (Mylotarg®; American Home Products). Los expertos en la técnica apreciarán que las citotoxinas anteriores son en su mayoría productos naturales y que algunas modificaciones de estas, es decir, derivatización, puede ser deseable o necesaria para hacerlas listas para la conjugación.

55 Un alquilante de unión de ranura menor de ADN preferido es un análogo o un derivado de CC-1065 y las duocarmicinas estructuralmente relacionadas, ejemplos adecuados de los cuales se describen en Ng y otros, US 7,087,600 B2 (2006); Ng y otros, US 6,989,452 B2 (2006); Ng y otros, US 7,129,261 B2 (2006); Ng y otros, WO 02/096910 A1 (2002); Boyd y otros, US 2006/0024317 A1 (2006); Chen y otros, US 2006/0004081 A1 (2006); Gangwar y otros, US 2006/0247295 A1 (2006); Boyd y otros, WO 2007/038658 A2 (2007); Gangwar y otros, WO 2007/051081 A1 (2007); Gangwar y otros, WO 2007/059404 A2 (2007); Sufi y otros, WO 2008/083312 A2 (2008); y Chen y otros, solicitud de patente PCT núm. PCT/US2008/054362, presentada el 20 de Febrero de 2008. Tales moléculas D asociadas preferidas pueden representarse por la fórmula (b):

5



10

en donde

el sistema de anillos A es un arilo sustituido o no sustituido, un heteroarilo sustituido o no sustituido, un grupo heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, tal como fenilo o pirrol;

15

E y G son independientemente H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, un heteroátomo, o un enlace sencillo, o E y G se unen para formar un sistema de anillo seleccionado del arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido y heterocicloalquilo sustituido o no sustituido;

X es O, S o NR<sup>23</sup>, donde R<sup>23</sup> es un H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido o acilo;

R<sup>3</sup> es (=O) u OH;

20

R<sup>4</sup>, R<sup>4'</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup> son independientemente H, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, halógeno, NO<sub>2</sub>, NR<sup>15</sup>R<sup>16</sup>, NC(O)R<sup>15</sup>, OC(=O)NR<sup>15</sup>R<sup>16</sup>, OC(=O)OR<sup>15</sup>, C(=O)R<sup>15</sup>, SR<sup>15</sup>, OR<sup>15</sup>, CR<sup>15</sup>=NR<sup>16</sup>, o O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, donde n es un número entero de 1 a 20 o cualquier par adyacente de R<sup>4</sup>, R<sup>4'</sup>, R<sup>5</sup> y R<sup>5'</sup>, junto con los átomos de carbono a los que están unidos, se unen para formar un sistema de anillo de cicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido que tiene de 4 a 6 miembros;

25

R<sup>15</sup> y R<sup>16</sup> son independientemente H, alquilo sustituido o no sustituido, heteroalquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocicloalquilo sustituido o no sustituido o peptidilo sustituido o no sustituido donde R<sup>15</sup> y R<sup>16</sup> junto con el átomo de nitrógeno al que están enlazados se unen opcionalmente para formar un sistema de anillo heterocicloalquilo sustituido o no sustituido que tiene de 4 a 6 miembros, que contiene opcionalmente dos o más heteroátomos;

30

R<sup>6</sup> es un enlace simple que está o bien presente o ausente;

R<sup>7</sup> es CH<sub>2</sub>-X<sup>1</sup> o -CH<sub>2</sub>-, con la condición de que cuando R<sup>6</sup> está presente, R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> se unen para formar un anillo ciclopropilo; y

X<sup>1</sup> es un grupo saliente tal como Cl, Br, F, mesilato o tosilato.

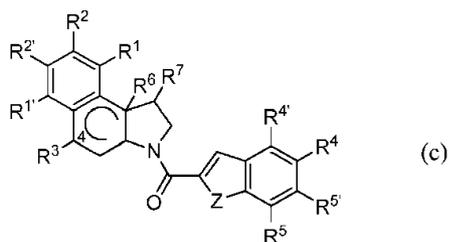
35

Una molécula asociada de fórmula (b) puede conjugarse a través de una R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>4'</sup>, R<sup>5</sup>, y R<sup>5'</sup>, preferentemente a través de R<sup>3</sup> (cuando R<sup>3</sup> es OH) o R<sup>4</sup>, con mayor preferencia a través de R<sup>4</sup>. Además, R<sup>3</sup> puede portar una porción de profármaco, como se discute en la presente descripción más abajo.

40

Una molécula asociada preferida de fórmula (b) está representada por la fórmula (c):

45



50

en donde

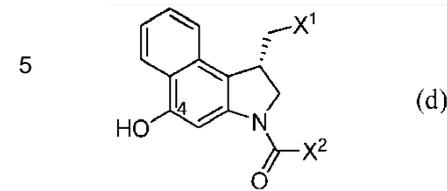
R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>4'</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>5'</sup>, R<sup>6</sup>, y R<sup>7</sup> son como se definió anteriormente;

Z es O, NH, o N(alquilo inferior); y

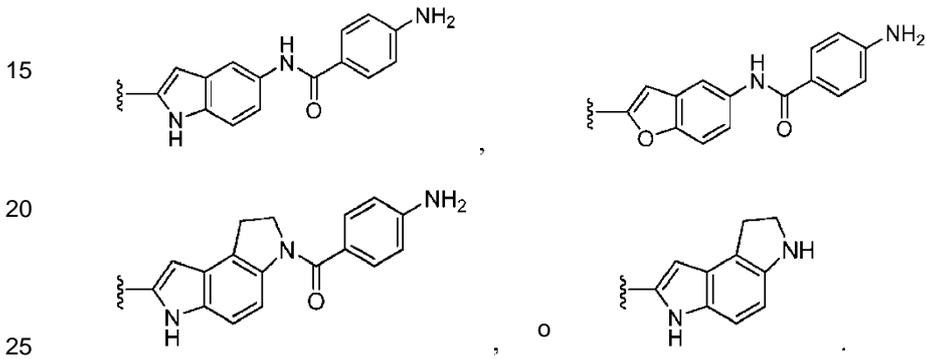
55

R<sup>1</sup>, R<sup>1'</sup>, R<sup>2</sup>, y R<sup>2'</sup> son independientemente H, alquilo inferior sustituido o no sustituido, ciano, alcoxi, halógeno, C(=O)R<sup>8</sup>, o CO<sub>2</sub>R<sup>8</sup>, en donde R<sup>8</sup> es NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup> o OR<sup>9</sup>, en donde R<sup>9</sup> y R<sup>10</sup> son independientemente H, alquilo sustituido o no sustituido, o heteroalquilo sustituido o no sustituido.

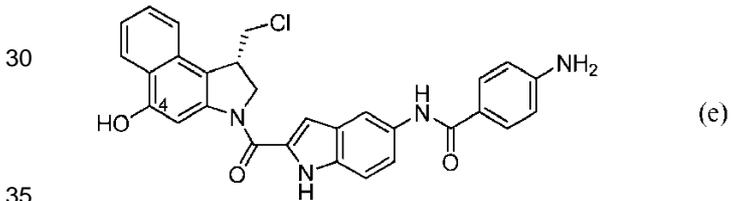
Una modalidad con mayor preferencia se muestra en la fórmula (d):



en donde X<sup>1</sup> es como se definió anteriormente y X<sup>2</sup> es

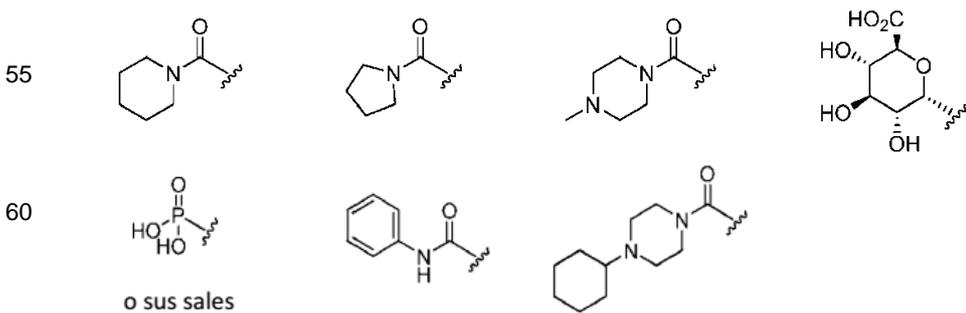


Un ejemplo de una molécula D asociada específica se representa por la fórmula (e):



40 Cuando la molécula D asociada es una citotoxina, puede ser profármaco, es decir, se ha unido a ella una porción profármaco cuya eliminación es necesaria para activarla. Preferentemente, el grupo profármaco (1) se elimina mediante un mecanismo de reacción distinto del de la escisión de la citotoxina del conjugado, (2) no se elimina o sólo se elimina lentamente mientras el conjugado está en circulación en el plasma sanguíneo, pero, (3) se elimina eficazmente en el tejido o célula objetivo. Consecuentemente, si el conjugado se escinde ventajosamente antes de llegar al tejido o célula objetivo, la citotoxina se libera en su forma de profármaco aún inactiva, eliminando o reduciendo la citotoxicidad hacia tejidos o células no objetivo. Es decir, el requisito de una segunda escisión para activar la citotoxina proporciona un factor de seguridad. En el ejemplo de una citotoxina de conformidad con las fórmulas (b), (c), (d) o (e), un sitio preferido para la unión de un grupo profármaco está en la posición marcada con un "4". Para aumentar el factor de seguridad en el que la escisión del grupo C y la eliminación de la porción del profármaco están mediadas ambas por enzimas, es preferible que participen diferentes enzimas.

50 Ejemplos no limitantes de grupos de profármacos incluyen ésteres, carbamatos, fosfatos y glicósidos. Para ilustrar, el hidroxilo de posición-4 en las citotoxinas de fórmulas ((b)-(e) puede ser profármaco con las siguientes porciones de profármaco:



65

La molécula D asociada puede ser también un marcador. El marcador puede ser cualquier marcador que genere una señal detectable, tales como un marcador radiactivo, un marcador fluorescente o una enzima que cataliza una modificación detectable por un sustrato. Los marcadores (denominados además, grupos indicadores o marcadores detectables) son bien conocidos en el campo de los inmunoensayos, la investigación biomédica y el diagnóstico médico y pueden detectarse por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmuoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. El marcador es preferentemente un isótopo radiactivo, un agente fluorescente o quimioluminiscente o precursor de este, un cromóforo, una enzima o sus combinaciones. Ejemplos de enzimas adecuadas son la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la  $\beta$ -galactosidasa y la glucosa oxidasa. Los agentes fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina y 2,3-dihidroftalazinedionas tales como luminol.

Ligando  $-(X^Z)_aC(X^D)_b-$

Como se hizo notar anteriormente, la porción de unión de un conjugado de esta invención comprende hasta tres elementos: un grupo C escindible y espaciadores opcionales  $X^Z$  y  $X^D$ .

El grupo C escindible se selecciona de manera que sea relativamente estable mientras el conjugado está en la circulación general en el plasma sanguíneo, pero se escinde fácilmente una vez que el conjugado alcanza su sitio de acción deseada. Preferentemente, el conjugado se internaliza por endocitosis por una célula objetivo al unirse el anticuerpo Z a un antígeno mostrado en la superficie de la célula objetivo. Posteriormente, la escisión del grupo C ocurre en un cuerpo vesicular de la célula objetivo (un endosoma temprano, un endosoma tardío o, especialmente, un lisosoma).

En una modalidad, el grupo C es un grupo sensible al pH. El pH en el plasma sanguíneo está ligeramente por encima del neutro, mientras que el pH dentro de un lisosoma es ácido, alrededor de 5. Por lo tanto, un grupo C cuya escisión se cataliza con ácido se escindirán a una velocidad de varios órdenes de magnitud más rápida dentro de un lisosoma que en la velocidad del plasma sanguíneo. Ejemplos de grupos adecuados sensibles a los ácidos incluyen las cisonitrilamidas e hidrazonas, como se describe en Shen y otros, US 4,631,190 (1986); Shen y otros, US 5,144,011 (1992); Shen y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 1048-1054 (1981) y Yang y otros, *Proc. Natl Acad. Sci (USA)*, 85, 1189-1193 (1988).

En otra modalidad, el grupo C es un disulfuro. Los disulfuros pueden escindirse mediante un mecanismo de intercambio tiol-disulfuro, a una velocidad que depende de la concentración de tiol en el ambiente. Como la concentración intracelular del glutatión y otros tioles es mayor que sus concentraciones séricas, la velocidad de disociación de un disulfuro será mayor intracelularmente. Además, la velocidad de intercambio de tiol-disulfuro puede modularse mediante el ajuste de las características estéricas y electrónicas del disulfuro (p. ej., un disulfuro de alquil-arilo frente a un disulfuro de alquil-alquilo; la sustitución en el anillo arilo, etc.), propiciando el diseño de enlaces disulfuro que tienen una estabilidad sérica mejorada o una velocidad de escisión particular. Para información adicional relacionada con los grupos disulfuro escindibles en los conjugados, ver, p. ej., Thorpe y otros, *Cancer Res.* 48, 6396-6403 (1988); Santi y otros, US 2005/0287155 A1 (2005); Ng y otros, US 6,989,452 B2 (2006); Ng y otros, WO 2002/096910 A1 (2002); Boyd y otros, US 2006/0024317 A1 (2006); y Sufi y otros, WO 2008/083312 A2 (2008).

Un grupo C preferido comprende un enlace peptídico que se escinde preferentemente por una proteasa en el sitio de acción deseado, en oposición a una proteasa en el suero. Típicamente, el grupo C comprende de 1 a 20 aminoácidos, preferentemente de 1 a 6 aminoácidos, con mayor preferencia de 1 a 3 aminoácidos. El(los) aminoácido(s) puede(n) ser  $\alpha$ -aminoácidos naturales y/o no naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos derivados de los mismos, p.ej., hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato, citrulina, y o-fosfoserina. El término aminoácido incluye también, los análogos y miméticos de aminoácidos. Los análogos son compuestos que tienen la misma estructura general  $H_2N(R)CHCO_2H$  de un aminoácido natural, excepto que el grupo R no se encuentra entre los aminoácidos naturales. Ejemplos de análogos incluyen homoserina, norleucina, metionina-sulfóxido y metionina-metilsulfonio. Un mimético de aminoácidos es un compuesto que tiene una estructura diferente de la estructura química general de un  $\alpha$ -aminoácido pero funciona de manera similar a uno. El término "aminoácido no natural" pretende representar la forma estereoquímica "D", siendo los aminoácidos naturales de la forma "L".

Preferentemente, el grupo C contiene una secuencia de aminoácidos que es una secuencia de reconocimiento de escisión para una proteasa. Muchas secuencias de reconocimiento de escisión se conocen en la técnica. Ver, p. ej., Matayoshi y otros, *Science* 247: 954 (1990); Dunn y otros, *Meth. Enzymol.* 241: 254 (1994); Seidah y otros, *Meth. Enzymol.* 244: 175 (1994); Thornberry, *Meth. Enzymol.* 244: 615 (1994); Weber y otros, *Meth. Enzymol.* 244: 595 (1994); Smith y otros, *Meth. Enzymol.* 244: 412 (1994); y Bouvier y otros, *Meth. Enzymol.* 248: 614 (1995).

Para los conjugados que no se destinan a ser internalizados por una célula, se puede escoger un grupo C de manera que se escinde por una proteasa presente en la matriz extracelular en la vecindad del tejido objetivo, p. ej., una proteasa liberada por las células muertas cercanas o una proteasa asociada a tumores. Las proteasas asociadas a tumores extracelulares ilustrativas son thimet oligopeptidasa (TOP) y CD10.

Para los conjugados que están diseñados para ser internalizados por una célula, el grupo C comprende preferentemente una secuencia de aminoácidos seleccionada para la escisión por una proteasa endosómica o lisosomal, especialmente la última. Los ejemplos no limitantes de tales proteasas incluyen las catepsinas B, C, D, H, L y S, especialmente la catepsina B. La catepsina B escinde preferentemente los péptidos en una secuencia -AA<sup>2</sup>-AA<sup>1</sup>- donde AA<sup>1</sup> es un aminoácido básico o fuertemente unido a hidrógeno (tal como lisina, arginina o citrulina) y AA<sup>2</sup> es un aminoácido hidrofóbico (tal como fenilalanina, valina, alanina, leucina o isoleucina), por ejemplo Val-Cit (donde Cit denota citrulina) o Val-Lys. (En la presente, las secuencias de aminoácidos se escriben en la dirección N a C, como en H<sub>2</sub>N-AA<sup>2</sup>-AA<sup>1</sup>-CO<sub>2</sub>H, a menos que el contexto se indique claramente de cualquier otra forma). Para información adicional respecto a los grupos catepsina-escindible, ver Dubowchik y otros, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8, 3341-3346 (1998); Dubowchik y otros, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8 3347-3352 (1998); y Dubowchik y otros, *Bioconjugate Chem.* 13, 855-869 (2002).

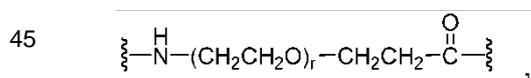
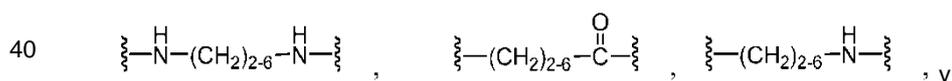
En una modalidad, el Grupo C es un péptido que comprende la secuencia de dos aminoácidos -AA<sup>2</sup>-AA<sup>1</sup>- en donde AA<sup>1</sup> es lisina, arginina o citrulina y AA<sup>2</sup> es fenilalanina, valina, alanina, leucina o isoleucina. En otra modalidad, C consiste en una secuencia de uno a cinco aminoácidos, seleccionados del grupo que consiste en Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (sec. con núm. de ident.:45), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser, y Glu.

La preparación y el diseño de los grupos C escindibles que comprenden un solo aminoácido se discute adicionalmente en Chen y otros, solicitud de patente PCT del documento de patente núm. PCT/US2008/054362, presentada el 20 de Febrero de 2008.

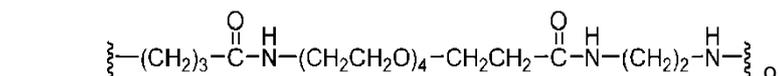
El grupo C puede ser también uno fotoescindible, por ejemplo un éter nitrobenzílico que se escinde al exponerse a la luz.

El grupo C puede unirse directamente al anticuerpo Z o molécula D asociada; es decir, los espaciadores X<sup>Z</sup> y X<sup>D</sup>, según sea el caso, pueden estar ausentes. Por ejemplo, si el grupo C es un disulfuro, uno de los dos sulfuros puede ser un residuo de cisteína o su sustituto en el anticuerpo Z. O, el grupo C puede ser una hidrazona unida a un aldehído en una cadena lateral de carbohidrato. O bien, el grupo C puede ser un enlace peptídico formado con un grupo ε-amino de la lisina del anticuerpo Z.

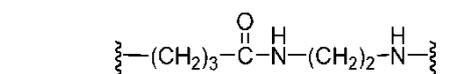
Cuando está presente, el espaciador X<sup>Z</sup> proporciona la separación espacial entre el grupo C y el anticuerpo Z, para que los primeros interfieran estéricamente con la unión del antígeno por los últimos o los últimos interfieran estéricamente con la escisión del primero. Además, el espaciador X<sup>Z</sup> puede usarse para conferir mayor solubilidad o propiedades de agregación disminuidas a los conjugados. Un espaciador X<sup>Z</sup> puede comprender uno o más segmentos modulares, que pueden ensamblarse en cualquier número de combinaciones. Ejemplos de segmentos adecuados para un espaciador X<sup>Z</sup> son:



donde el subíndice r es 1 a 24, preferentemente 2 a 4. Estos segmentos pueden combinarse para hacer los espaciadores X<sup>Z</sup> tales como:



55



60

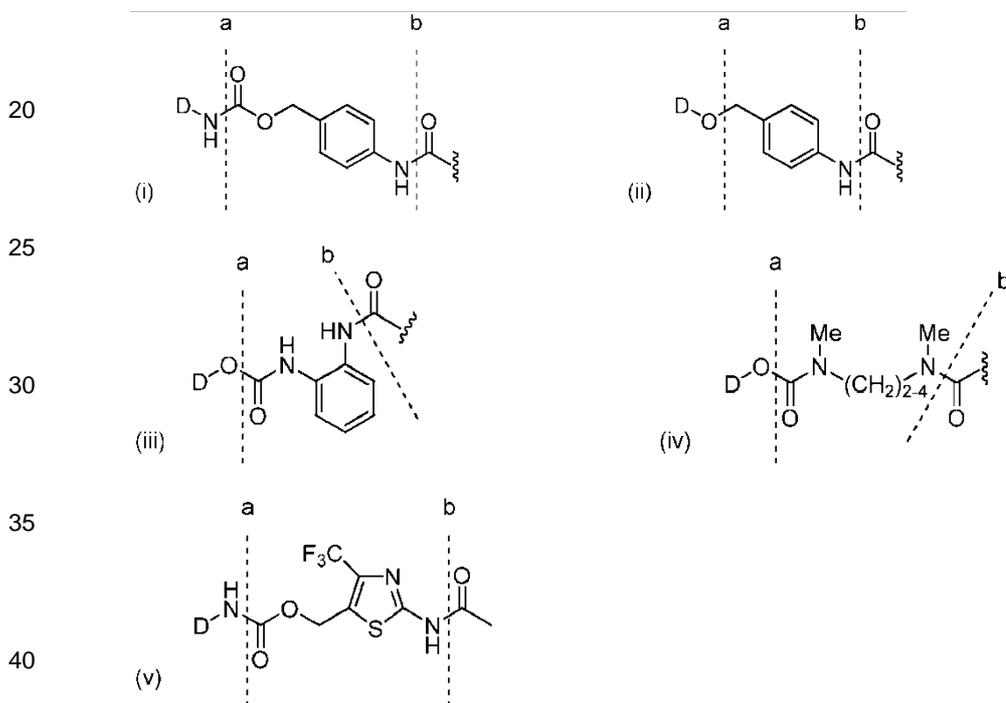
El espaciador X<sup>D</sup>, si está presente, proporciona la separación espacial entre el grupo C y la molécula D asociada, a menos que el último interfiera estéricamente o electrónicamente con la escisión del primero. Espaciador X<sup>D</sup> puede servir además, para introducir la masa molecular adicional y funcionalidad química en un conjugado. Generalmente, la masa y la funcionalidad adicional afectarán la vida útil sérica y otras propiedades del conjugado. Por lo tanto, mediante la selección juiciosa de grupos espaciadores, puede modularse la vida útil sérica de un conjugado. El espaciador X<sup>D</sup> puede

65

ensamblarse además, a partir de segmentos modulares, como se describió anteriormente en el contexto del espaciador  $X^Z$ .

Ya sea el espaciador  $X^Z$  o  $X^D$ , o ambos, pueden comprender una porción autosuficiente. En resumen, una porción autosuficiente es una porción que (1) está unida al grupo C y el anticuerpo Z o la molécula D asociada y (2) tiene una estructura tal que la escisión del grupo C inicia una secuencia de reacción que resulta en la porción autosuficiente para autodesprenderse del anticuerpo Z o de la molécula D asociada (escisión del grupo C), según sea el caso. En otras palabras, una reacción en un sitio distal del anticuerpo Z o molécula D asociada (escisión del grupo C) provoca que el enlace  $X^Z$ -Z o el  $X^D$ -D también se rompan. La presencia de una porción autosuficiente es deseable en el caso del espaciador  $X^D$  porque, si después de la escisión del conjugado, el espaciador  $X^D$  o una parte de este permanece unido a la molécula D asociada, la actividad biológica de esta última puede afectarse. Se prefiere especialmente el uso de una porción autosuficiente donde el grupo escindible C es un polipéptido.

Ejemplos de porciones autosuficientes (i)-(v) unidos a un grupo hidroxilo o amino en una molécula D asociada se muestran más abajo:

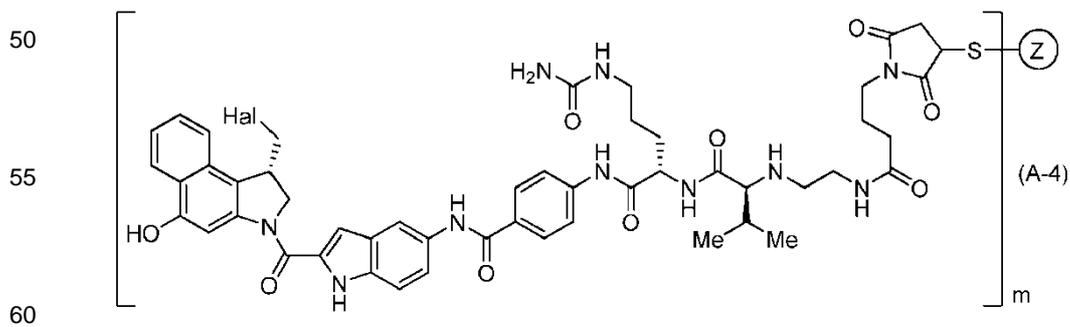
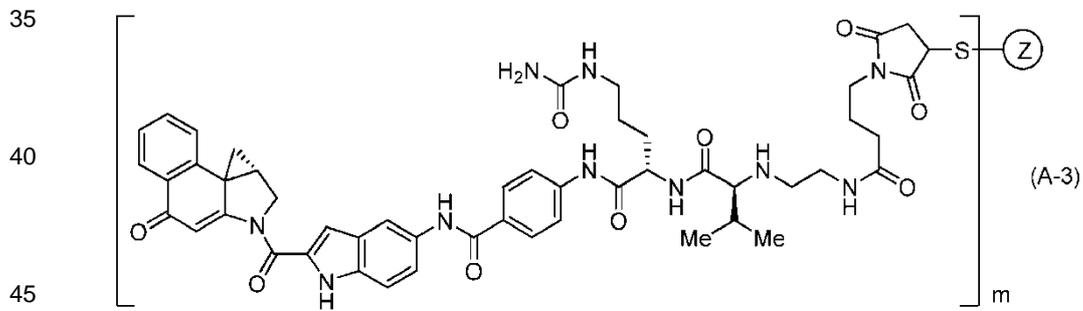
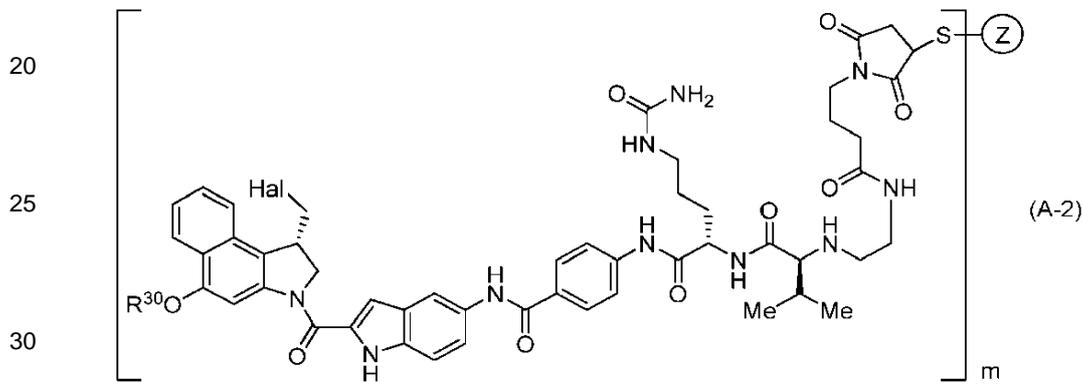
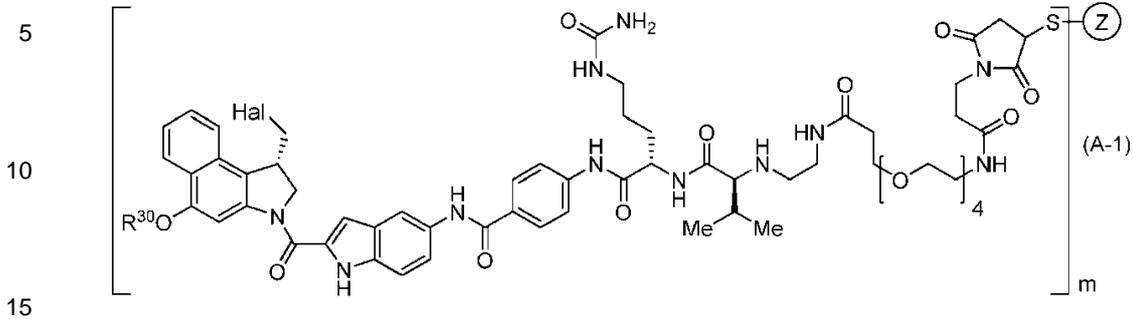


En cada ejemplo, la porción autosuficiente es la estructura entre las líneas punteadas a y b, con las características estructurales adyacentes mostradas para proporcionar el contexto. Las porciones autosuficientes (i) y (v) se unen a una molécula  $D-NH_2$  (es decir, la molécula D asociada se conjuga a través de un grupo amino), mientras que las porciones autosuficientes (ii), (iii) y (iv) se unen a una molécula D asociada-OH (es decir, la molécula D asociada se conjuga a través de un grupo hidroxilo). La escisión del enlace amida en la línea de puntos b (es decir, el grupo C es un péptido) libera el nitrógeno de la amida como nitrógeno de amina, iniciando una secuencia de reacción que resulta en la escisión del enlace en la línea de puntos a y la consecuente liberación de la molécula D asociada-OH o  $D-NH_2$ , según sea el caso. Para descripciones adicionales con respecto a las porciones autosuficientes, ver, Carl y otros, *J. Med. Chem.*, 24 (3), 479-480 (1981); Carl y otros, WO 81/01145 (1981); Dubowchik y otros, *Pharmacology & Therapeutics*, 83, 67-123 (1999); Firestone y otros, US 6,214,345 B1 (2001); Toki y otros, *J. Org. Chem.* 67, 1866-1872 (2002); Doronina y otros, *Nature Biotechnology* 21 (7), 778-784 (2003) (errata, pág. 941); Boyd y otros, WO 2005/112919 (2005); Boyd y otros, WO 2007/038658 (2007); Sufi y otros, WO 2008/083312 A2 (2008); Feng, US 7,375,078 B2 (2008); y Senter y otros, US 2003/0096743 A1 (2003).

#### Ejemplos de conjugados

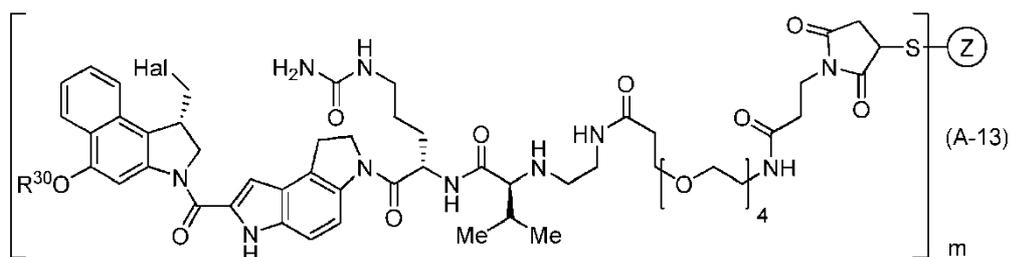
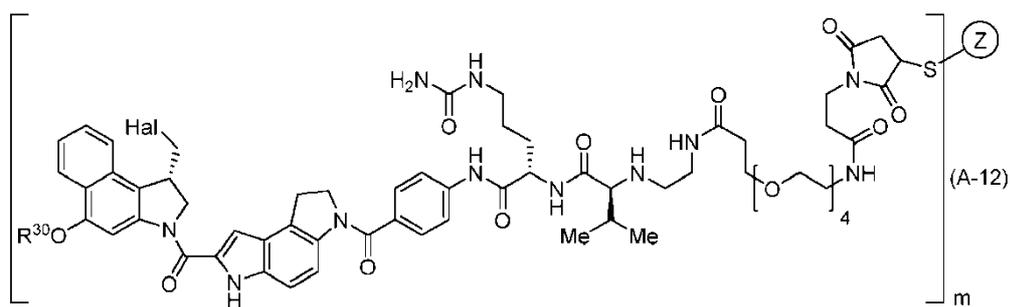
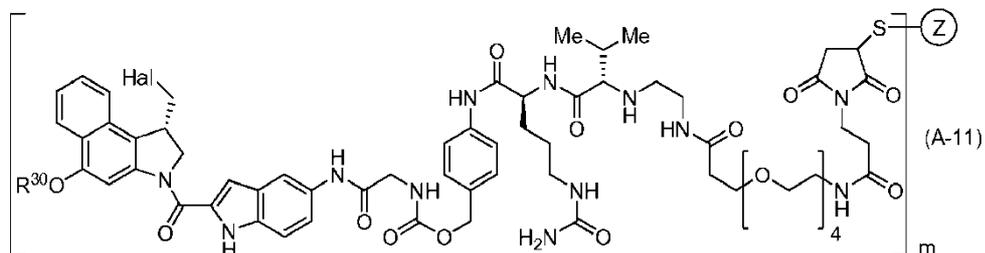
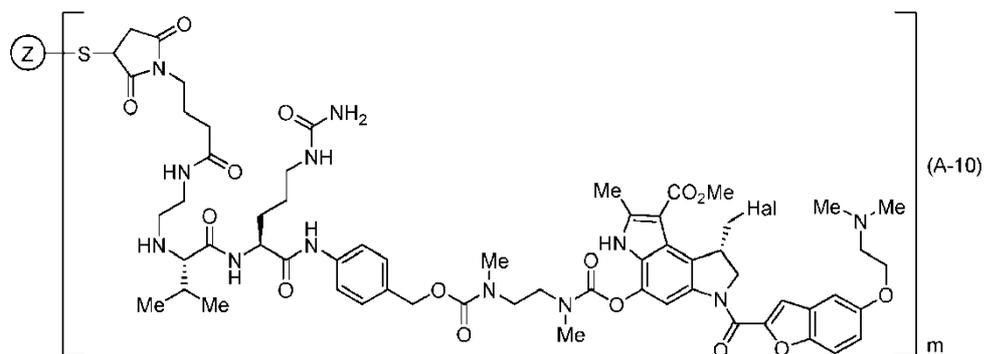
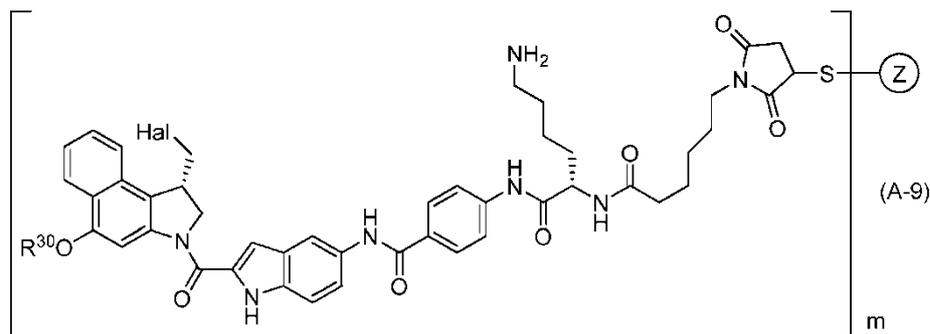
Ejemplos de conjugados fabricados con un anticuerpo  $Z(SH)_m$  de esta invención (donde m es 1, 2, 3, 4 o 5) se muestran más abajo. Los conjugados A-1 a A-6 y A-8 a A-15 son conjugados en los que el grupo C escindible comprende un enlace peptídico. Los conjugados A-7 y A-16 son conjugados en los que el grupo escindible C es una hidrazona. Los conjugados A-17 y A-18 son conjugados en los que el grupo escindible C es un disulfuro. En los conjugados A-1 a A-2, A-5 a A-9, A-11 a A-14, y A-16, la molécula D asociada es una citotoxina que tiene una porción profármaco unido a la misma. Los conjugados A-10, A-11, A-14 y A-15 son conjugados que tienen una porción autosuficiente (dos en el caso

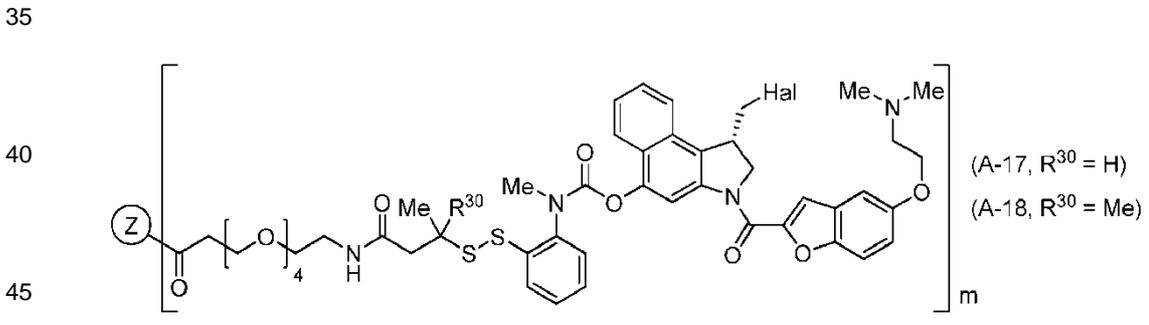
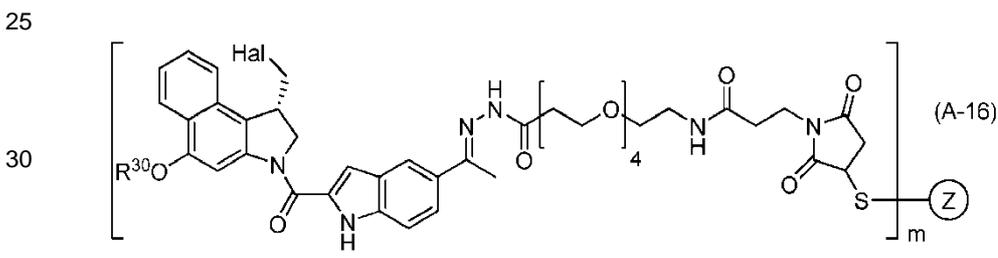
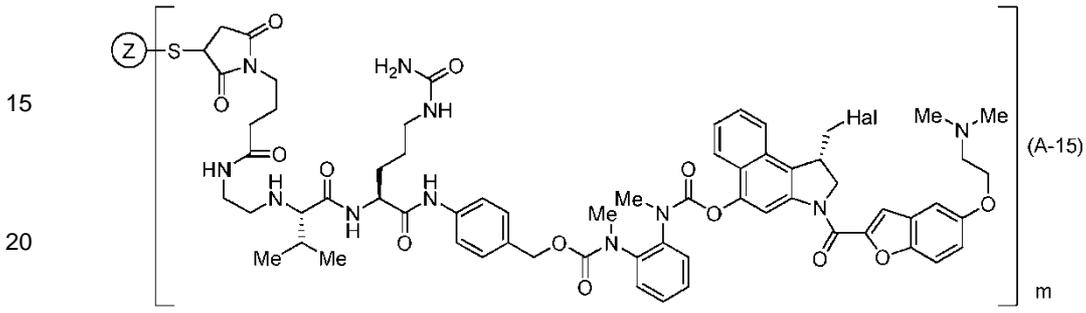
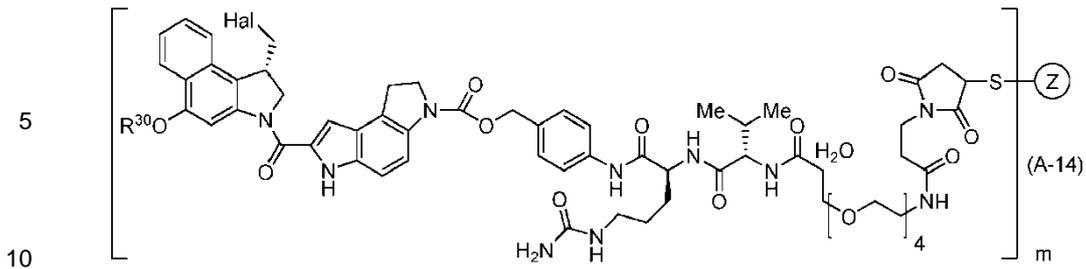
del conjugado A-10). Los conjugados A-1 a A-8 y A-10 a A-18 ilustran el uso de espaciadores que tienen segmentos modulares.



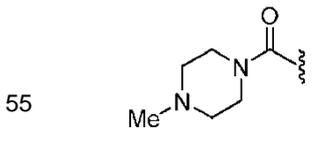
65





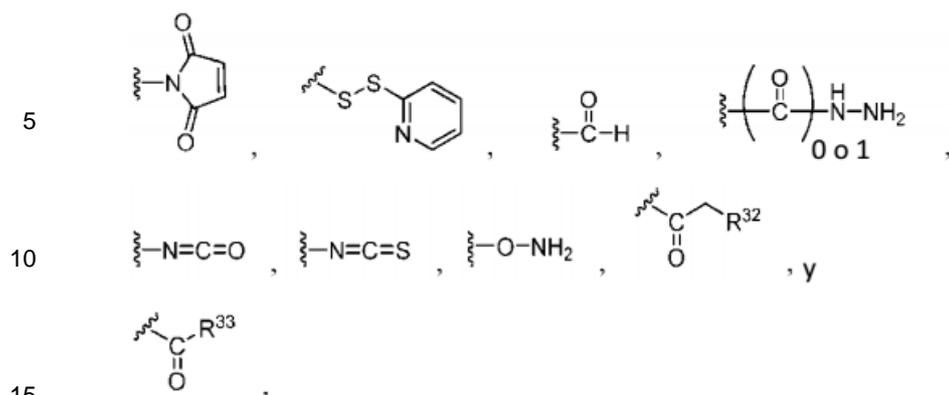


50 Cuando está presente en las fórmulas precedentes, Hal es Cl o Br y R<sup>30</sup> es el grupo de profármaco carbamato escindible por carboxi-esterasa mostrado más abajo:



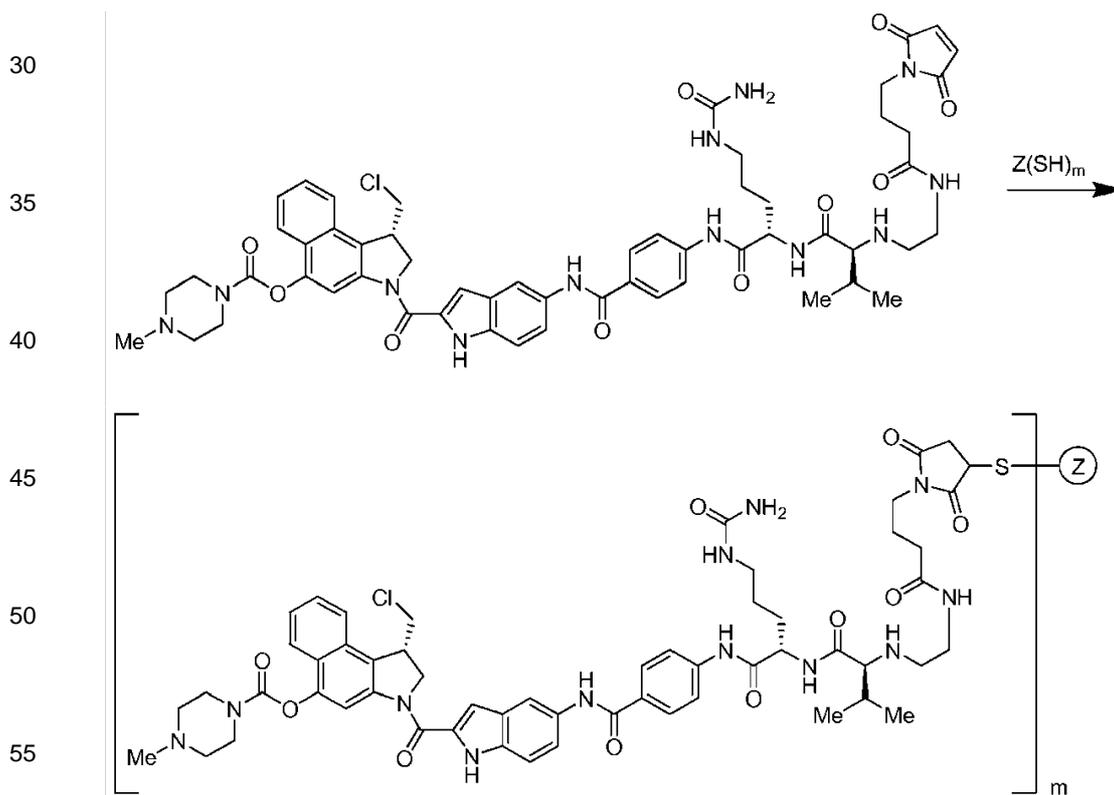
60 Preparación de Conjugados

65 Los conjugados de esta invención se preparan preferentemente uniendo primero la molécula D asociada y el ligando (X<sup>Z</sup>)<sub>a</sub>C(X<sup>D</sup>)<sub>b</sub> para formar una porción D-(X<sup>Z</sup>)<sub>a</sub>C(X<sup>D</sup>)<sub>b</sub>-R<sup>31</sup>, donde R<sup>31</sup> es un grupo funcional adecuado para poner a reaccionar con un grupo funcional en el anticuerpo Z, para formar el conjugado. Ejemplos de grupos R<sup>21</sup> adecuados incluyen:



donde  $R^{32}$  es Cl, Br, F, mesilato o tosilato y  $R^{33}$  es Cl, Br, I, F, OH, -O-N-succinimidilo, -O-(4-nitrofenil), -O-pentafluorofenilo, o -O-tetrafluorofenilo. La preparación de porciones adecuadas  $D-(X^Z)_aC(X^D)_b-R^{31}$  se describen en Ng y otros, US 7,087,600 B2 (2006); Ng y otros, US 6,989,452 B2 (2006); Ng y otros, US 7,129,261 B2 (2006); Ng y otros, WO 02/096910 A1 (2002); Boyd y otros, US 2006/0024317 A1 (2006); Chen y otros, US 2006/0004081 A1 (2006); Gangwar y otros, US 2006/0247295 A1 (2006); Boyd y otros, WO 2007/038658 A2 (2007); Gangwar y otros, WO 2007/051081 A1 (2007); Gangwar y otros, WO 2007/059404 A2 (2007); Sufi y otros, WO 2008/083312 A2 (2008); y Chen y otros, solicitud PCT del documento núm. PCT/US2008/054362, presentada el 20 de febrero de 2008.

En una modalidad preferida (fórmula M),  $R^{31}$  es un grupo maleimida y el grupo funcional en el anticuerpo Z es un grupo tiol como se ilustra a continuación, usando el conjugado A-2, donde Hal es Cl y el anticuerpo  $Z(SH)_m$ :



Fórmula M

El siguiente es un procedimiento ilustrativo, basado en la introducción de grupos tiol libres en un anticuerpo mediante la reacción de sus grupos  $\epsilon$ -amino de lisina con 2-iminotiolano, seguido de reacción con una porción fármaco-ligando  $D-(X^Z)_aC(X^D)_b-R^{31}$ , donde  $R^{31}$  es maleimida. Inicialmente, se intercambi6 el tamp6n del anticuerpo por tamp6n de fosfato 0,1 M (pH 8,0) que contiene NaCl 50 mM y DTPA 2 mM y se concentr6 hasta 5-10 mg/mL. La tiolaci6n se logra mediante la adici6n de 2-iminotiolano al anticuerpo. La cantidad de 2-iminotiolano que se a6ade puede determinarse mediante un experimento preliminar y varía de anticuerpo a anticuerpo. En el experimento preliminar, se a6ade al anticuerpo una titulaci6n de cantidades crecientes de 2-iminotiolano, y despu6s de la incubaci6n con el anticuerpo

durante 1 h a temperatura ambiente, el anticuerpo se desaliniza en tampón HEPES 50 mM pH 6,0 usando una columna Sephadex G-25 y se determinó rápidamente el número de grupos tiol introducidos determinados por reacción con ditiodipiridina (DTDP). La reacción de los grupos tiol con DTDP resulta en la liberación de tiopiridina, que puede monitorizarse espectroscópicamente a 324 nm. Se usan típicamente muestras a una concentración de proteína de 0,5-1,0 mg/mL. La absorbancia a 280 nm puede usarse para determinar con precisión la concentración de proteína en las muestras y después, se incubaba una alícuota de cada muestra (0,9 ml) con 0,1 ml de DTDP (solución madre 5 mM en etanol) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Muestras en blanco de tampón solo más DTDP también se incuban a la par. Después de 10 min, se mide la absorbancia a 324 nm y se cuantifica el número de grupos tiol usando un coeficiente de extinción para la tiopiridina de  $19,800 \text{ M}^{-1}$ .

Típicamente, en este procedimiento se desea un nivel de tiolación de tres grupos tiol por anticuerpo. Por ejemplo, con algunos anticuerpos puede lograrse esto añadiendo un exceso molar de 15 veces de 2-iminotiolano seguido de la incubación a temperatura ambiente durante 1 h. Después se incubaba el anticuerpo con 2-iminotiolano a la relación molar deseada y después se desaliniza en tampón de conjugación (tampón HEPES 50 mM pH 6,0 que contiene glicina 5 mM y DTPA 2 mM). El material tiolado se mantiene sobre hielo mientras se cuantifica el número de tioles introducidos tal como se describió anteriormente.

Después de verificar el número de tioles introducidos, se agrega la porción fármaco-ligando  $\text{D}-(\text{X}^Z)_a\text{C}(\text{X}^D)_b\text{-R}^{31}$  con un exceso molar de 3 veces por tiol. Se deja proseguir la reacción de conjugación en el tampón de conjugación que también contiene una concentración final de dimetilsulfóxido al 5% (DMSO), o un disolvente alternativo similar. Comúnmente, la disolución madre de fármaco-ligando se disuelve en DMSO al 100%. La solución madre se añade directamente al anticuerpo tiolado, que tiene suficiente DMSO añadido para llevar la concentración final al 10%, o se diluye previamente en tampón de conjugación que contiene una concentración final de DMSO al 10%, seguido por la adición de un volumen igual de anticuerpo tiolado.

La mezcla de reacción de conjugación se incubaba a temperatura ambiente durante 2 h con agitación. Después de la incubación, la mezcla de reacción de conjugación se centrifuga y se filtra a través de un filtro de  $0,2 \mu\text{m}$ . La purificación del conjugado puede lograrse mediante la cromatografía usando una serie de métodos. En un método, el conjugado se purifica usando cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Sephacryl S200 preequilibrada con tampón HEPES 50 mM a pH 7,2 que contiene 5 mM de glicina y 50 mM de NaCl. La cromatografía se realiza a una velocidad de flujo lineal de 28 cm/h. Las fracciones que contienen conjugado se recogen, se mezclan y se concentran. En un método alternativo, la purificación puede lograrse mediante la cromatografía de intercambio iónico. Las condiciones varían de un anticuerpo a otro y deben optimizarse en cada caso. Por ejemplo, la mezcla de reacción del conjugado anticuerpo-fármaco se aplica a una columna de SP-Sefarosa pre-equilibrada con 50 mM de HEPES pH 5,5 que contiene 5 mM de glicina. El conjugado del anticuerpo se eluye usando un gradiente de 0-1 M de NaCl con tampón de equilibrio a pH 5,5. Las fracciones relevantes que contienen el conjugado se combinan y se dializan frente al tampón de formulación (tampón HEPES 50 mM a pH 7,2 que contiene 5 mM de glicina y 100 mM de NaCl).

Los expertos en la técnica entenderán que las condiciones y la metodología descritas anteriormente son ilustrativas y no limitantes y que otros enfoques para los anticuerpos de conjugación se conocen en la técnica y son utilizables en la presente invención.

#### ADEPT

En otra modalidad, un anticuerpo de acuerdo con esta invención se conjuga con una enzima para su uso en la terapia de profármacos de la enzima dirigida al anticuerpo (ADEPT). En la ADEPT, una enzima se orienta por el anticuerpo hacia un sitio del tumor al cual se conjuga. Allí, la enzima actúa sobre un profármaco administrado posteriormente para liberar localmente el fármaco activo correspondiente. Ver, p.ej., Melton y otros, J. Natl Cancer Inst. 88(3/4), 153-165 (1996). Ejemplos de enzimas que pueden conjugarse para su uso en la ADEPT incluyen carboxipeptidasa A y G2, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -lactamasa,  $\beta$ -glucosidasa, penicilina amidasa, aminopeptidasa, citosina desaminasa y nitrorreductasa.

Debido a que la ADEPT no requiere la liberación de la enzima del anticuerpo, la presencia de un grupo escindible entre el anticuerpo y la enzima no es obligatoria. Por lo tanto, un conjugado de la ADEPT puede representarse por la fórmula (f)

Z-X-D (f)

donde Z es un anticuerpo de esta invención; D es una enzima, y X es un ligando que conecta Z y D.

#### Inmunoconjugados

Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan como "inmunotoxinas".

Las citotoxinas pueden conjugarse con anticuerpos de la invención usando la tecnología de ligando disponible en la técnica. Ejemplos de tipos de enlace que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero no

se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y ligandos que contienen péptidos. Puede seleccionarse un ligando que sea, por ejemplo, susceptible a la escisión por pH bajo dentro del compartimento lisosómico o susceptible a la escisión por proteasas, tales como proteasas preferentemente expresadas en el tejido tumoral tales como catepsinas (p. ej., catepsinas B, C, D).

5

#### Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente invención presenta moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-CADM1, o un fragmento de este, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o sus porciones de unión al antígeno, pueden derivatizarse o enlazarse a otra molécula funcional, p. ej., otro péptido o proteína (p. ej., otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar un molécula biespecífica que une al menos dos sitios de unión diferentes o moléculas objetivo. Un anticuerpo puede derivatizarse o enlazarse a más de una molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se unen a más de dos sitios de unión diferentes y/o moléculas objetivo; tales moléculas multiespecíficas se pretende sean abarcadas también por el término "molécula biespecífica" como se usa en la presente descripción. Para crear una molécula biespecífica, un anticuerpo de la invención puede estar funcionalmente enlazado (p. ej., mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de cualquier otra manera) a una o más moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un péptido o mimético de unión, de manera que resulta en una molécula biespecífica.

10

15

20

25

30

35

40

En consecuencia, la presente invención incluye las moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para CADM1 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo objetivo. En una modalidad particular de la invención, el segundo epítipo objetivo es un receptor Fc, p. ej., FcγRI (CD64) humano o un receptor humano Fcα (CD89). Por lo tanto, la invención incluye las moléculas biespecíficas capaces de unirse tanto a FcγR o FcαR que expresan células efectoras (p. ej., monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)), y a células objetivo que expresan CADM1. Estas moléculas biespecíficas CADM1 objetivo expresan las células efectoras y desencadenan las actividades de células efectoras mediadas por el receptor Fc, tales como fagocitosis de células que expresan CADM1, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), liberación de citoquinas, o generación de anión superóxido.

En una modalidad de la invención en la que la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir además una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-CADM1. En una modalidad, la tercera especificidad de unión es una porción del factor antipotencia, p. ej., una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y, de ese modo, aumenta la respuesta inmune contra la célula objetivo. La "porción del factor antipotencia" puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, p. ej., un antígeno o un receptor, y de ese modo, resulta en un incremento del efecto de los determinantes de unión para el receptor Fc o antígeno de la célula objetivo. La "porción del factor antipotencia" puede unirse a un receptor de Fc o un antígeno de la célula objetivo. Alternativamente, la parte del factor antipotencia puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen las primeras y segundas uniones de especificidades de unión. Por ejemplo, la parte del factor antipotencia puede unirse a una célula T citotóxica (p. ej. a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmune que resulta en una respuesta inmune aumentada contra la célula objetivo).

45

En una modalidad, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo de este, que incluye, p. ej., un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fd, dAb, o una cadena simple de Fv. El anticuerpo puede además ser un dímero de la cadena ligera o de la cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o un constructo de cadena simple como se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 4,946,778 de Ladner y otros.

50

55

En una modalidad, la especificidad de unión para un receptor Fcγ se proporciona mediante un anticuerpo monoclonal, cuya unión no está bloqueada por la inmunoglobulina G (IgG) humana. Como se usa en la presente descripción, el término "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena y localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas del receptor transmembrana o soluble que se agrupan en tres clases de receptor Fcγ: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y FcγRIII (CD16). En una modalidad preferida, el receptor Fcγ es un FcγRI de alta afinidad humana. El FcγRI humano es una molécula de 72 kDa, que muestra alta afinidad por la IgG monómera ( $10^8 - 10^9 M^{-1}$ ).

60

65

La producción y caracterización de ciertos anticuerpos monoclonales anti-Fcγ preferidos se describen en la publicación PCT del documento de patente WO 88/00052y en la patente de los Estados Unidos núm. 4,954,617 de Fanger y otros. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de FcγRI, FcγRII o FcγRIII en un sitio que es distinto del sitio de unión Fcγ del receptor y, por lo tanto, su unión no se bloquea sustancialmente por los niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos anti-FcγRI específicos útiles en esta invención son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. El hibridoma que produce el mAb 32 está disponible en la Colección de Cultivo Tipo Americana, ATCC núm. de acceso HB9469. En otras modalidades, el anticuerpo anti-receptor de Fcγ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F. y otros, (1995) *J. Immunol* 155 (10): 4996-5002 y la publicación PCT del documento de patente WO 94/10332 de Tempest y otros. La línea celular

productora del anticuerpo H22 se depositó en la Colección de Cultivo Tipo Americana, bajo la designación HA022CL1 y tiene el núm. de acceso CRL 11177.

En otras modalidades preferidas, la especificidad de unión para un receptor Fc se proporciona por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humano, p. ej., un receptor Fc-alfa (FcαRI (CD89)), cuya unión preferentemente, no se bloquea por la inmunoglobulina A (IgA) humana. El término "receptor IgA" pretende incluir el producto génico de un gen α (FcαRI) situado en el cromosoma 19. Se conoce que este gen codifica varias isoformas transmembranales empalmadas alternativamente de 55 a 110 kDa. FcαRI (CD89) se expresa constitutivamente en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinofílicos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. FcαRI tiene una afinidad media ( $\approx 5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) tanto para IgA1 como para IgA2, que se incrementa tras la exposición a citoquinas tales como G-CSF or GM-CSF (Morton, H.C. y otros, (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de FcαRI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a FcαRI fuera del dominio de unión al ligando de IgA (Monteiro, R.C. y otros (1992) *J. Immunol.* 148:1764).

FcαRI y FcγRI son receptores desencadenantes preferidos para su uso en las moléculas biespecíficas de la invención porque se (1) expresan principalmente en las células efectoras inmunes, p. ej., monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a niveles elevados (p. ej., 5.000-100.000 por célula); (3) son mediadores de las actividades citotóxicas (p. ej., ADCC, fagocitosis); y (4) median la presentación mejorada del antígeno de los antígenos, incluyendo autoantígenos, dirigidos a ellos.

Aunque se prefieren los anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que pueden emplearse en las moléculas biespecíficas de la invención son los anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas de la presente invención pueden prepararse conjugando las especificidades de unión constituyentes, p. ej., las especificidades de unión anti-FcR y anti-CADM1, usando los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica puede generarse por separado y luego conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, una variedad de agentes de acoplamiento o reticulación pueden usarse para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetilo-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (ver p. ej., Karpovsky y otros (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA y otros, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* núm. 78, 118-132; Brennan y otros, (1985) *Science* 229:81-83, y Glennie y otros, (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, Illinois).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, ellos pueden conjugarse a través de enlaces sulfhidrilo del C-terminal de las regiones bisagra de las dos cadenas pesadas. En una modalidad particularmente preferida, la región bisagra se modifica para contener un número impar de residuos sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es un mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> o ligando x la proteína de fusión Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena simple que comprende un anticuerpo de cadena simple y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena simple que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena simple. Los métodos para preparar las moléculas biespecíficas se describen en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,260,203; 5,455,030; 4,881,175; 5,132,405; 5,091,513; 5,476,786; 5,013,653; 5,258,498; y 5,482,858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus objetivos específicos puede confirmarse mediante, por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), el análisis FACS, bioensayo (p. ej., inhibición del crecimiento), o ensayo de transferencia de membranas de tipo Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos anticuerpo-proteína de interés particular empleando un reactivo marcado (p. ej., un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos de anticuerpo FcR pueden detectarse usando, p. ej., un anticuerpo o fragmento de anticuerpo ligado a enzima que reconoce y se une específicamente a los complejos FcR-anticuerpo. Alternativamente, los complejos pueden detectarse usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radioactivamente y usarse en un radioinmunoensayo (RIA) (ver, por ejemplo, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, Marzo, 1986). El isótopo radioactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador  $\square$  o un contador de centelleo o por autorradiografía.

#### Miméticos de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos

La presente invención no se limita a los anticuerpos tradicionales y puede practicarse mediante el uso de fragmentos de anticuerpo. En la presente descripción se describen, además, miméticos de anticuerpos. Como se detalla más abajo, actualmente se han desarrollado una amplia variedad de tecnologías de fragmentos de anticuerpos y miméticos de

anticuerpos y son ampliamente conocidas en la técnica. Si bien una serie de estas tecnologías, como los anticuerpos de dominio, Nanobody® y Unibody® utilizan fragmentos de, u otras modificaciones de, las estructuras de anticuerpos tradicionales, también existen tecnologías alternativas, como Affibody®, DARPin®, Anticalinas, Avimer® y Versabody® que emplean estructuras de unión que, aunque imitan la unión del anticuerpo tradicional, se generan a partir de y funcionan a través de distintos mecanismos.

Los Anticuerpos de Dominio (dAb) son las unidades de unión funcional más pequeñas de los anticuerpos, que se corresponden a las regiones variables ya sea de las cadenas pesadas (VH) o ligeras (VL) de los anticuerpos humanos. Los Anticuerpos de dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Domantis ha desarrollado una serie de genotecas grandes y altamente funcionales de los dAb de VH y VL completamente humanos (más de diez mil millones de secuencias diferentes en cada genoteca), y utiliza estas genotecas para seleccionar los dAb que son específicos a los objetivos terapéuticos. A diferencia de muchos anticuerpos convencionales, los Anticuerpos de dominio se expresan bien en los sistemas de células bacterianas, de levadura y de mamíferos. Detalles adicionales de los anticuerpos de dominio y sus métodos de producción pueden obtenerse mediante referencia a la patente de los Estados Unidos núm. 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; 6,696,245; solicitud de los Estados Unidos con núm. de serie 2004/0110941; la solicitud de patente Europea núm. 1433846 y las patentes Europeas 0368684 y 0616640; los documentos de patente WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609.

Los Nanobody® son proteínas terapéuticas que se derivan de los anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de la cadena pesada de origen natural. Estos anticuerpos de la cadena pesada contienen un dominio variable simple (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). Es importante destacar, que el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga la capacidad completa de unión al antígeno del anticuerpo de cadena pesada original. Los Nanobody® tienen una alta homología con los dominios VH de los anticuerpos humanos y pueden humanizarse además sin ninguna pérdida de la actividad. Es importante destacar, que los Nanobody® tienen un potencial inmunogénico bajo, lo que se ha confirmado en estudios de primates con compuestos líderes de los Nanobody®.

Los Nanobody® combinan las ventajas de los anticuerpos convencionales con las características importantes de los fármacos de molécula pequeña. Similar a los anticuerpos convencionales, los Nanobody® muestran alta especificidad por su objetivo, alta afinidad por su objetivo y baja toxicidad inherente. Sin embargo, al igual que los fármacos de moléculas pequeñas, pueden inhibir las enzimas y acceder fácilmente a las hendiduras de los receptores. Además, los Nanobody® son extremadamente estables, pueden administrarse por distintos medios de inyección (ver, p. ej., el documento núm. WO 04/041867) y son fáciles de fabricar. Otras ventajas de los Nanobody® incluyen reconocer epítomos poco comunes u ocultos como resultado de su pequeño tamaño, que se unen en cavidades o sitios activos de objetivos proteicos con alta afinidad y selectividad debido a su flexibilidad única en formato de fármaco tridimensional, adaptación a la vida útil y la facilidad y la velocidad de descubrimiento de fármacos.

Los Nanobody® se codifican por genes únicos y se producen eficientemente en casi todos los huéspedes procariontas y eucariotas, p. ej. E. coli (ver, p. ej., el documento de patente US 6,765,087), mohos (por ejemplo, Aspergillus o Trichoderma) y levadura (por ejemplo Saccharomyces, Kluyveromyces, Hansenula o Pichia) (ver, p. ej. el documento de patente US6,838,254). El proceso de producción es escalable y se han producido cantidades de múltiples kilogramos de Nanobody®. Debido a que los Nanobody® exhiben una estabilidad superior en comparación con los anticuerpos convencionales, pueden formularse como una solución de larga vida útil, listo para su uso.

El método de Nanoclon (ver, p. ej. el documento de patente núm. WO 06/079372) es un método patentado para generar Nanobody® contra un objetivo deseado, basado en la selección optimizada automática de células B y puede usarse en el contexto de la presente invención.

Los Unibody® son otra tecnología de fragmentos de anticuerpos; sin embargo, ésta se basa en la eliminación de la región bisagra de los anticuerpos IgG4. La delección de la región bisagra resulta en una molécula que es esencialmente la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales y tiene una región de unión univalente en lugar de la región de unión bivalente de los anticuerpos IgG4. Se conoce bien además, que los anticuerpos IgG4 son inertes y, por lo tanto, no interactúan con el sistema inmune, lo que puede ser ventajoso para el tratamiento de enfermedades en las que no se desea una respuesta inmunitaria y esta ventaja se transmite a los Unibody®. Por ejemplo, los Unibody® pueden funcionar para inhibir o silenciar, pero no para matar, a las células a las que se unen. Adicionalmente, la unión de Unibody® a las células cancerosas no estimula su proliferación. Además, debido a que los Unibody® tienen aproximadamente la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales, pueden mostrar una mejor distribución sobre tumores sólidos más grandes con una eficacia potencialmente ventajosa. Los Unibody® se depuran del cuerpo a una velocidad similar a los anticuerpos IgG4 enteros y son capaces de unirse con una afinidad similar a sus antígenos que los anticuerpos enteros. Detalles adicionales de los Unibody® pueden obtenerse mediante la referencia al documento de la patente núm. WO2007/059782.

Las moléculas Affibody® representan una nueva clase de proteínas de afinidad basadas en un dominio de la proteína del residuo de 58 aminoácidos, que se deriva de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A estafilocócica. Este dominio de haz de tres hélices se ha usado como una estructura para la construcción de genotecas combinatorias de fagémidos, a partir de las cuales pueden seleccionarse variantes de Affibody® que se orientan a las moléculas

deseadas y pueden seleccionarse usando tecnología de presentación en fagos (Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an  $\alpha$ -helical bacterial receptor domain, *Nat Biotechnol* 1997;15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, *Eur J Biochem* 2002;269:2647-55.). La estructura simple y robusta de las moléculas Affibody® en combinación con su bajo peso molecular (6 kDa), las hace adecuadas para una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo, como reactivos de detección (Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, y otros, Construction and characterization of Affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*, *J Immunol Methods* 2002;261:199-211) y para inhibir las interacciones del receptor (Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, *Protein Eng* 2003;16:691-7). Detalles adicionales de los Affibody® y sus métodos de producción pueden obtenerse mediante referencia a la patente de Estados Unidos núm. 5831012.

Los Affibody® marcados pueden ser útiles también en aplicaciones de imágenes para determinar la abundancia de las isoformas.

Las DARPin® (Proteínas de Repetición de Anquirina Diseñadas) son un ejemplo de una tecnología de anticuerpos miméticos DRP (Proteína de Repetición Diseñada) que se ha desarrollado para explotar las capacidades de unión de polipéptidos no anticuerpos. Las proteínas repetidas, como la anquirina o las proteínas repetidas ricas en leucina, son moléculas de unión ubicuas, que ocurren, a diferencia de los anticuerpos, intra y extracelularmente. Su arquitectura modular única presenta unidades estructurales repetitivas (repeticiones), que se apilan juntas para formar dominios de repetición alargados que muestran superficies de unión al objetivo variables y modulares. Basado en esta modularidad, pueden generarse genotecas combinatorias de polipéptidos con especificidades de unión altamente diversificadas. Esta estrategia incluye el diseño de consenso de repeticiones autocompatibles que muestran residuos de superficie variables y su ensamblado aleatorio en dominios repetitivos.

Las DARPin® pueden producirse en sistemas de expresión bacteriana con rendimientos muy elevados y pertenecen a las proteínas más estables que se conocen. Se han seleccionado las DARPin® de alta afinidad, muy específicas para un amplio intervalo de proteínas objetivo, que incluyen receptores humanos, citoquinas, quinasas, proteasas humanas, virus y proteínas de membrana. Pueden obtenerse las DARPin® que tienen afinidades en el intervalo nanomolar a picomolar de un solo dígito.

Las DARPin® se han usado en un amplio intervalo de aplicaciones, que incluyen el ELISA, ELISA sándwich, análisis de citometría de flujo (FACS), inmunohistoquímica (IHC), aplicaciones de chips, purificación por afinidad o transferencia en membranas de tipo Western. Las DARPin® demostraron además, ser altamente activas en el compartimento intracelular, por ejemplo, como proteínas marcadoras intracelulares fusionadas con la proteína fluorescente verde (GFP). Las DARPin® se usaron además para inhibir la entrada viral con IC50 en el intervalo pM. Las DARPin® no sólo son ideales para bloquear las interacciones proteína-proteína, sino además para inhibir las enzimas. Las proteasas, quinasas y transportadores se han inhibido con éxito, más frecuentemente en un modo de inhibición alostérica. Los enriquecimientos muy rápidos y específicos en el tumor y las relaciones muy favorables del tumor con respecto a la sangre hacen que las DARPin® sean adecuadas para enfoques diagnósticos o terapéuticos in vivo.

La información adicional con respecto a las DARPin y otras tecnologías de DRP puede encontrarse en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2004/0132028, y en la publicación de la solicitud de patente internacional núm. WO 02/20565.

Las Anticalin® son una tecnología adicional de mimetismo de anticuerpos, sin embargo, en este caso la especificidad de unión se deriva de las lipocalinas, una familia de proteínas de bajo peso molecular que se expresan natural y abundantemente en los tejidos humanos y fluidos corporales. Las lipocalinas han evolucionado para llevar a cabo un intervalo de funciones in vivo asociadas con el transporte fisiológico y el almacenamiento de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Las lipocalinas tienen una estructura intrínseca robusta que comprende un barril  $\beta$  altamente conservado que soporta cuatro lazos en un extremo de la proteína. Estos lazos forman la entrada a un bolsillo de unión y las diferencias conformacionales en esta parte de la molécula explican la variación en la especificidad de unión entre las lipocalinas individuales.

Aunque la estructura completa de los lazos hipervariables soportada por un marco de hoja  $\beta$  conservada es reminiscente de las inmunoglobulinas, las lipocalinas difieren considerablemente de los anticuerpos en términos de tamaño, siendo compuestas por una única cadena polipeptídica de 160 a 180 aminoácidos que es marginalmente más larga que un dominio de la inmunoglobulina simple.

Las lipocalinas se clonan y sus lazos se someten a ingeniería genética para crear las Anticalin®. La genotecas de Anticalin® estructuralmente diversas se han generado y la Anticalin® permite mostrar la selección y tamizaje de la función de unión, seguido por la expresión y la producción de la proteína soluble para análisis posterior en los sistemas de procariontes o eucariontes. Los estudios han demostrado con éxito que pueden desarrollarse las Anticalin® que son específicas para que cualquier proteína humana objetivo que pueda aislarse virtualmente y puedan obtenerse afinidades de unión en el intervalo nanomolar o superior.

Las Anticalin® pueden formatearse además, como proteínas de doble orientación, denominadas Duocalin®. Una Duocalin® se une a dos objetivos terapéuticos separados en una proteína monomérica de fácil producción usando procesos de fabricación estándar, mientras que conserva la especificidad y afinidad del objetivo a pesar de la orientación estructural de sus dos dominios de unión.

5

La modulación de múltiples objetivos a través de una sola molécula es particularmente ventajosa en las enfermedades conocidas que involucran más de un simple factor causal. Además, los formatos de unión bi o multivalentes como las Duocalin® tienen un potencial significativo en orientar las moléculas a la superficie celular en la enfermedad, mediar los efectos agonistas en las vías de transducción de señales o inducir efectos de internalización mejorados a través de la unión y el agrupamiento de los receptores de la superficie celular. Además, la alta estabilidad intrínseca de las Duocalin® es comparable con la Anticalin® monomérica, lo que ofrece una formulación flexible y un potencial de suministro para las Duocalin®.

10

La información adicional con respecto a las Anticalin® puede encontrarse en la patente de los Estados Unidos núm. 7,250,297, y en la publicación de la solicitud de patente internacional núm. WO 99/16873.

15

Otra tecnología mimética de anticuerpo útil en el contexto de la presente invención son los Avimer®. Los Avimer® se desarrollan a partir de una gran familia de dominios de receptores extracelulares humanos mediante el reordenamiento del exón in vitro y la presentación en fagos, lo que genera proteínas multidominios con propiedades de unión e inhibición. La unión de múltiples dominios de unión independientes ha demostrado crear avidéz y resulta en una afinidad y una especificidad mejoradas en comparación con las proteínas de unión a un solo epítipo convencional. Otras ventajas potenciales incluyen la producción simple y eficiente de las moléculas específicas multiobjetivos en Escherichia coli, termoestabilidad mejorada y resistencia a proteasas. Los Avimer® con afinidades subnanomolares se han obtenido contra una variedad de objetivos.

20

Puede encontrarse información adicional sobre los Avimer® en las publicaciones de solicitudes de patentes de los Estados Unidos núms. 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756.

25

Los Versabody® son otra tecnología mimética de anticuerpos que puede usarse en el contexto de la presente invención. Los Versabody® son pequeñas proteínas de 3-5 kDa con >15% de cisteínas, que forman una estructura de alta densidad de disulfuro, reemplazando al núcleo hidrofóbico que tienen las proteínas típicas. El reemplazo de un gran número de aminoácidos hidrófobos, que comprenden el núcleo hidrófobo, con un número pequeño de disulfuros da como resultado una proteína que es más pequeña, más hidrófila (menos agregación y unión no específica), más resistente a las proteasas y al calor, y tiene una menor densidad de epítopos de células T, porque los residuos que más contribuyen a la presentación del MHC son hidrófobos. Estas cuatro propiedades se conocen bien que afectan la inmunogenicidad, y juntas se espera que causen una gran disminución en la inmunogenicidad.

30

La inspiración para los Versabody® proviene de los productos biofarmacéuticos inyectables naturales producidos por las sanguijuelas, serpientes, arañas, escorpiones, caracoles y anémonas, que se sabe exhiben inesperadamente baja inmunogenicidad. A partir de las familias de proteínas naturales seleccionadas, mediante el diseño y la selección del tamaño, la hidrofobicidad, el procesamiento del antígeno proteolítico y la densidad del epítipo se minimizan a niveles muy por debajo del promedio de las proteínas naturales inyectables.

40

Dada la estructura de los Versabody®, estos miméticos de anticuerpos ofrecen un formato versátil que incluye la multivalencia, multiespecificidad, una diversidad de mecanismos de vida útil, módulos de orientación a tejidos y la ausencia de la región Fc del anticuerpo. Además, los Versabody® se fabrican en E. coli con altos rendimientos, y debido a su hidrofiliidad y tamaño pequeño, los Versabody® son altamente solubles y pueden formularse a altas concentraciones. Los Versabody® son excepcionalmente estables al calor (pueden hervirse) y ofrecen una vida útil prolongada.

45

La información adicional sobre los Versabody® puede encontrarse en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2007/.

50

La descripción detallada del fragmento de anticuerpo y las tecnologías miméticas de anticuerpos proporcionadas anteriormente no pretenden ser una lista completa de todas las tecnologías que pueden usarse en el contexto de la presente especificación. Por ejemplo, y además, no a modo de limitación, una variedad de tecnologías adicionales que incluyen las tecnologías basadas en polipéptidos alternativos, tales como fusiones de regiones determinantes de la complementariedad como se describe en Qui y otros, Nature Biotechnology, 25(8) 921-929 (2007), así como las tecnologías basadas en ácidos nucleicos, tales como las tecnologías de aptámeros de ARN descritas en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,789,157, 5,864,026, 5,712,375, 5,763,566, 6,013,443,6,376,474, 6,613,526, 6,114,120, 6,261,774, y6,387,620, podrían usarse en el contexto de la presente invención.

55

65

## Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, p. ej., una composición farmacéutica, que contiene un o una combinación de anticuerpos monoclonales, o porción(es) de unión al antígeno de estos, de la presente invención, formulada junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir un o una combinación de (p. ej., dos o más) anticuerpos, o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la invención. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la invención puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o biespecíficos) que se unen a diferentes epítomos en el antígeno objetivo o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse además, en la terapia de combinación, es decir, combinado con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-CADM1 de la presente invención combinado con al menos otro agente antiinflamatorio o inmunosupresor. Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden usarse en terapia de combinación se describen con mayor detalle más abajo en la sección sobre usos de los anticuerpos de la invención.

Como se usa en la presente descripción, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos o que retardan la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (p. ej., por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, inmunoconjugado, o molécula biespecífica, puede recubrirse con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que mantiene la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confiere ningún efecto toxicológico indeseado (ver p. ej., Berge, S.M., y otros (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición ácidas y sales de adición básicas. Las sales de adición ácidas incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como también a partir de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y dicarboxílico alifáticos, ácidos alcanóicos fenil sustituidos ácidos hidroxil alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición básicas incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como también de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica de la invención puede incluir además, un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de surfactantes.

Estas composiciones pueden contener además adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionante y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización, arriba, y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede efectuarse por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersiones. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Exceptuando en la medida de lo posible que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de este en las composiciones farmacéuticas de la invención. Compuestos activos suplementarios pueden incorporarse también en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El portador puede ser un medio de dispersión o solvente que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propileno glicol, polietileno y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de éstos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitolo cloruro de sodio. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede producirse por la inclusión en la composición de un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con un o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización con microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un portador estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril previamente filtrada de éste.

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única variará en dependencia del sujeto que se trata, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única, generalmente, será aquella cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de cien por ciento, esta cantidad estará en el intervalo de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferentemente de aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, con preferencia superlativa de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (p. ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un único bolo puede administrarse, varias dosis divididas pueden administrarse en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa en la presente descripción se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias de los sujetos que se tratan; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que debe alcanzarse, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de componer tales compuestos activos para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Para la administración del anticuerpo, el intervalo de las dosificaciones se encuentra de aproximadamente 0,0001 y 100 mg/kg, y más usualmente de 0,01 y 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ejemplar implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a seis meses. Los regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti-CADM1 de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante la administración intravenosa, con el anticuerpo siendo usado con uno de los siguientes esquemas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, después cada tres meses; ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez, seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado cae dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo se administra generalmente en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones individuales pueden ser, por ejemplo, semanales, mensuales, cada tres meses o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indica mediante la medición de los niveles sanguíneos del anticuerpo al antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg /ml y en algunos métodos de aproximadamente 25-300 µg /ml.

Alternativamente, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la vida útil del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran una vida útil más larga, seguida por anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un largo período de tiempo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, se requiere

a veces una dosis relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y preferentemente hasta que el paciente muestre una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de eso, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

5 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que es efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares empleadas en la presente invención, o el éster, sal o amida de este, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica anterior del paciente a tratar, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

15 Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-CADM1 de la invención conduce preferentemente a una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de los periodos libres de síntomas de enfermedad o una prevención de impedimento o discapacidad debido a la aflicción de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de CADM1<sup>+</sup> tumores, una "dosificación terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en al menos aproximadamente 20%, más preferentemente en al menos aproximadamente 40%, aún más preferentemente en al menos aproximadamente 60% y todavía con mayor preferencia en al menos aproximadamente 80% con respecto a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento del tumor puede evaluarse en un sistema de modelo animal de eficacia predictiva en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, tal inhibición puede medirse *in vitro* por ensayos conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de cualquier otra manera los síntomas en un sujeto. Un experto en la técnica puede ser capaz de determinar tales cantidades basadas en factores de este tipo como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

30 Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas de los anticuerpos de la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras parenterales, por ejemplo mediante inyección o infusión. Las frases "administración parenteral" como se usa en la presente descripción se refiere a los modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitarse a, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal e infusión.

40 Alternativamente, un anticuerpo de la invención puede administrarse por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

45 Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluyen implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno y acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos para los expertos en la técnica. Ver, p. ej., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una modalidad preferida, una composición farmacéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tales como los dispositivos descritos en las patentes de los Estados Unidos núms. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; o 4,596,556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos que son útiles en la presente invención incluyen: la patente de los Estados Unidos núm. 4,487,603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; la patente de los Estados Unidos núm. 4,486,194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de los Estados Unidos núm. 4,447,233, que describe una bomba de infusión de medicación para el suministro de la medicación a una velocidad precisa de infusión; la patente de los Estados Unidos núm. 4,447,224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para el suministro continuo de fármaco; la patente de los Estados Unidos núm. 4,439,196, que describe un sistema osmótico de suministro de fármaco que tiene compartimientos multicámaras; y la patente de los Estados Unidos núm. 4,475,196, que describe un sistema osmótico de suministro de fármaco. Muchos otros implantes de este tipo, sistemas de suministro, y módulos, se conocen bien por aquellos con experiencia en la técnica.

65

En ciertas modalidades, los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden formularse para asegurar la adecuada distribución *in vivo*. Por ejemplo, la barrera sangre-cerebro (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, ver, p. ej., las patentes de los Estados Unidos 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones que se transportan selectivamente en las células u órganos específicos, mejorando, de ese modo, el suministro de fármaco dirigido (ver, p. ej., V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Las porciones de direccionamiento ilustrativas incluyen folato o biotina (ver, p. ej., la Patente de los Estados Unidos núm. 5,416,016 otorgada a Low y otros); manósidos (Umezawa y otros, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman y otros (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais y otros (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de proteína A surfactante (Briscoe y otros, (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier y otros (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); ver además K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

## 15 Usos y Métodos

Los anticuerpos, particularmente los anticuerpos humanos, las composiciones de anticuerpos y los métodos de la presente invención tienen numerosas utilidades terapéuticas *in vitro* e *in vivo* que implican el tratamiento de trastornos mediados por CADM1. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a las células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, a sujetos humanos, *por ejemplo, in vivo*, para tratar una variedad de cánceres humanos. Como se usa en la presente, el término "sujeto" pretende incluir animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, p. ej., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos mediados por la actividad CADM1. Los métodos son particularmente adecuados para tratar pacientes humanos que tienen un trastorno asociado con la expresión de CADM1 aberrante. Cuando los anticuerpos contra CADM1 se administran junto con otro agente, los dos pueden administrarse en cualquier orden o de manera simultánea.

En un ejemplo, dada la unión específica de los anticuerpos de la invención para CADM1, los anticuerpos pueden usarse para detectar específicamente la expresión de CADM1 en la superficie de las células y, además, pueden usarse para purificar CADM1 mediante purificación por inmutofinidad.

Además, dada la expresión de CADM1 en varias células tumorales, los anticuerpos humanos, las composiciones de anticuerpos y los métodos de la presente invención pueden usarse para tratar un sujeto con un trastorno tumorigénico, p. ej., un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan CADM1 que incluyen, por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, leucemia de células T adultas, cánceres neuroendocrinos que incluyen los de pulmón, suprarrenal, pituitaria, tracto GI, riñón, hígado (que incluyen carcinomas hepatocelulares), páncreas (que incluyen insulinosomas y glucagonomas), glioblastomas y tumores carcinoides, que incluyen los de páncreas, pulmón, tracto GI, hígado o riñón.

En un ejemplo, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas y composiciones) pueden usarse para detectar niveles de CADM1 o niveles de células que contienen CADM1 en su superficie de membrana, cuyos niveles pueden relacionarse después con ciertos síntomas de la enfermedad. Alternativamente, los anticuerpos pueden usarse para inhibir o bloquear la función CADM1 que, a su vez, puede estar unida a la prevención o mejora de ciertos síntomas de la enfermedad, implicando de ese modo CADM1 como un mediador de la enfermedad. Esto puede lograrse poniendo en contacto una muestra y una muestra de control con el anticuerpo anti-CADM1 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CADM1. Todos los complejos formados entre el anticuerpo y CADM1 se detectan y comparan en la muestra y el control.

En otra modalidad, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas y composiciones) de la invención pueden probarse inicialmente para la actividad de unión asociada con el uso terapéutico o de diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden probarse usando los ensayos de citometría de flujo descritos en los Ejemplos más abajo.

Los anticuerpos (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas, inmunoconjugados y composiciones) de la invención tienen utilidad adicional en la terapia y diagnóstico de enfermedades relacionadas con CADM1. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos, las moléculas multiespecíficas o biespecíficas y los inmunoconjugados pueden usarse para inducir *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: inhibir el crecimiento de y/o destruir una célula que expresa CADM1; mediar la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa CADM1 en presencia de células efectoras humanas, o bloquear la unión del ligando CADM1 a CADM1.

En una modalidad particular, los anticuerpos (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas y composiciones) se usan *in vivo* para tratar, prevenir una variedad de cánceres humanos relacionados con CADM1. Ejemplos de tejidos de cáncer humano relacionados con CADM1 incluyen cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de páncreas neuroendocrino, cáncer de hígado, carcinoides de pulmón y carcinoides gastrointestinales.

Las rutas adecuadas para administrar las composiciones de anticuerpos (p. ej., anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención *in vivo* e *in vitro* se conocen bien en la técnica y pueden seleccionarse por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos pueden administrarse por inyección (p. ej., intravenosa o subcutánea). Las dosificaciones adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y peso del sujeto y de la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpo.

Como se describió anteriormente, los anticuerpos anti-CADM1 humanos de la invención pueden coadministrarse con uno u otros más agentes terapéuticos, p. ej., un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede enlazarse al agente (como inmunocomplejo) o puede administrarse separado del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o puede coadministrarse con otras terapias conocidas, p. ej., una terapia anticancerosa, p. ej., radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), cisplatino bleomicina sulfato, carmustina, clorambucilo y ciclofosfamida hidroxurea que, por sí solos, sólo son efectivos a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino se administra por vía intravenosa como una dosis de 100 mg/kg una vez cada cuatro semanas y la adriamicina se administra por vía intravenosa en forma de una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La coadministración de los anticuerpos humanos anti-CADM1, o fragmentos de unión a antígenos de estos, de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerígenos que actúan a través de diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico para las células tumorales humanas. Tal coadministración puede resolver los problemas debido al desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las harían no reactivas con el anticuerpo.

Pueden usarse además, como agentes terapéuticos células efectoras específicas para el objetivo, p. ej., células efectoras enlazadas a composiciones (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención. Las células efectoras para el direccionamiento pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células natural asesinas y otras células que llevan receptores IgG o IgA. Si se desea, pueden obtenerse células efectoras del sujeto que se trata. Las células efectoras específicas al objetivo pueden administrarse como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede ser del orden  $10^8$ - $10^9$  pero variará dependiendo del propósito terapéutico. Generalmente, la cantidad será suficiente para obtener la localización en la célula objetivo, p. ej., una célula tumoral que expresa CADM1, y para afectar la destrucción de las células mediante, p. ej., fagocitosis. Las vías de administración además pueden variar.

La terapia con células efectoras específicas al objetivo puede realizarse junto con otras técnicas para la eliminación de células objetivo. Por ejemplo, la terapia antitumoral usando las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención y/o células efectoras armadas con estas composiciones puede usarse junto con la quimioterapia. Además, la inmunoterapia combinada puede usarse para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas hacia el rechazo de células tumorales. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos anti-CADM1 enlazados a anti-Fc-gamma RI o anti-CD3 junto con agentes de unión específicos de receptor IgG o IgA.

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la invención además pueden usarse para modular los FcγR o niveles de FcγR en las células efectoras, tales como el recubrimiento y la eliminación de receptores en la superficie celular. Además pueden usarse mezclas de receptores anti-Fc para este propósito.

Las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención que tienen sitios de unión a complemento, tales como porciones de IgG1, -2, o -3 o IgM que se unen al complemento, además pueden usarse en presencia de complemento. En una modalidad, el tratamiento *ex vivo* de una población de células que comprende células objetivo con un agente de unión de la invención y células efectoras adecuadas puede suplementarse mediante la adición de complemento o complemento que contiene suero. La fagocitosis de las células objetivo recubiertas con un agente de unión de la invención puede mejorarse mediante la unión de las proteínas del complemento. En otra modalidad, las células objetivo recubiertas con las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención además pueden lisarse mediante el complemento. Aun en otra modalidad, las composiciones de la invención no activan el complemento.

Las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención además pueden administrarse junto con el complemento. En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona composiciones que comprenden anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones pueden ser ventajosas cuando el complemento se localiza en estrecha proximidad con los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas. Alternativamente, los anticuerpos humanos, las moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la invención y el complemento o suero pueden administrarse por separado.

Además se describen en la presente descripción kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la invención (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas o inmunoconjugados) e instrucciones para su uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos humanos adicionales de la invención (p. ej., un anticuerpo

humano que tiene una actividad complementaria que se une a un epítipo en el antígeno CADM1 distinto del primer anticuerpo humano).

5 Como consecuencia, los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la invención pueden administrarse adicionalmente (antes, de manera simultánea con o después de la administración de un anticuerpo humano de la invención) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que mejora o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

10 En otras modalidades, el sujeto puede tratarse adicionalmente con un agente que modula, p. ej., mejora o inhibe la expresión o actividad de Fcγ o los receptores Fcγ, por ejemplo, tratando al sujeto con una citoquina. Las citoquinas preferidas para la administración durante el tratamiento con la molécula multiespecífica incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el interferón (IFN-γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

15 Las composiciones (p. ej., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención además pueden usarse para dirigirse a células que expresan FcγR o CADM1, por ejemplo para etiquetar tales células. Para tal uso, el agente de unión puede enlazarse a una molécula que puede detectarse. Así, la invención proporciona métodos para localizar células *ex vivo* o *in vitro* que expresan receptores Fc, tales como FcγR o CADM1. El marcador detectable puede ser, p. ej., un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático.

20 En un ejemplo particular se describen los métodos para detectar la presencia de antígeno CADM1 en una muestra o para medir la cantidad de antígeno CADM1, que comprende poner en contacto la muestra y una muestra de control con un anticuerpo monoclonal humano o una porción de unión a antígeno de este, que se une específicamente a CADM1, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o porción de éste y CADM1. Después se detecta la formación de un complejo, en donde una formación de complejo diferente entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia de antígeno CADM1 en la muestra.

25 En otros ejemplos, la descripción proporciona métodos para tratar un trastorno mediado por CADM1 en un sujeto, p. ej., cánceres humanos, que incluyen cáncer de pulmón de células pequeñas, cánceres neuroendocrinos que incluyen los de pulmón, suprarrenal, pituitaria, tracto GI, riñón, hígado, páncreas (que incluyen insulinomas y glucagonomas), y tumores carcinoides que incluyen los de páncreas, pulmón, tracto GI, hígado o riñón.

30 Aun en otra modalidad, los inmunoconjugados de la invención pueden usarse para dirigir compuestos (p. ej., agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, inmunosupresores de radiotoxinas, etc.) a células que tienen receptores de superficie celular CADM1 enlazando tales compuestos al anticuerpo. Por ejemplo, puede conjugarse un anticuerpo anti-CADM1 a cualquiera de los compuestos de toxina descritos en las patentes de los Estados Unidos núms. 6,281,354 y 6,548,530, la publicación de patente de los Estados Unidos núms. 20030050331, 20030064984, 20030073852, y 20040087497, o publicado en el documento de patente WO 03/022806. Así, la invención proporciona además métodos para localizar células *ex vivo* o *in vivo* que expresen CADM1 (p. ej., con un marcador detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático). Alternativamente, los inmunoconjugados pueden usarse para destruir células que tienen receptores de superficie celular CADM1 dirigiendo las citotoxinas o radiotoxinas a CADM1.

40 La presente invención se ilustra además por los ejemplos siguientes, los cuales no deben interpretarse como otras limitantes.

## EJEMPLOS

50 Ejemplo 1: Generación de Anticuerpos Monoclonales Humanos contra el Antígeno CADM1

Se generó una proteína de fusión recombinante compuesta por el dominio extracelular de CADM1 (CADM1 ECD) enlazado a un polipéptido no CADM1 (proteína his) (sec. con núm. de ident.:44) por métodos recombinantes estándar y se usó como antígeno para la inmunización (ver más abajo).

55 Cepas transgénicas HuMAb Mouse<sup>®</sup> y KM Mouse<sup>®</sup>

60 Se prepararon anticuerpos monoclonales completamente humanos para CADM1 usando cepas HCo7 y HCo27 del HuMAb Mouse<sup>®</sup> transgénico y la cepa KM de ratones transcromosómicos transgénicos, cada uno de los cuales expresaba genes de anticuerpos humanos. En cada una de estas cepas de ratón, el gen endógeno de la cadena ligera kappa de ratón se ha interrumpido homocigóticamente como se describe en Chen y otros, (1993) *EMBO J.* 12:811-820 y el gen endógeno de la cadena pesada de ratón se ha interrumpido homocigóticamente como se describe en el Ejemplo 1 de la publicación PCT del documento de patente WO 01/09187. Cada una de estas cepas de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humano, KCo5, tal como se describe en Fishwild y otros, (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851. La cepa HCo7 porta el transgén de la cadena pesada humana HCo7 como se describe en la Patente de Estados Unidos Núms. 5,545,806; 5,625,825; y 5,545,807. La cepa HCo27 porta el transgén de cadena pesada humana HCo27

como se describe en la publicación PCT del documento de patente WO 01/09187. La cepa KM Mouse<sup>®</sup> contiene el transcromosoma SC20 como se describe en la Publicación PCT de documento de patente WO 02/43478.

#### Inmunizaciones de HuMab y KM

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos para CADM1, se inmunizaron ratones HuMab de las cepas de HCo7, HCo27 y KM Mouse con la proteína purificada recombinante CADM1-ECD-his. Los esquemas generales de inmunización para estos ratones se describen en Lonberg, N. y otros (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. y otros, (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 y publicación PCT de documento de patente WO 98/24884. Los ratones tenían de 6-16 semanas de edad tras la primera infusión de antígeno. Se usó una preparación recombinante purificada (5-50 µg) de proteína CADM1-ECD-his para inmunizar el HuMab y KM mouse<sup>®</sup>.

Los ratones transgénicos se inmunizaron con el antígeno en el adyuvante Ribi, ya sea intraperitonealmente (IP), subcutáneamente (Sc) o a través de la almohadilla de la pata (FP) en intervalos de 3-21 días (hasta un total de 9 inmunizaciones). La respuesta inmune se monitoreó por hemorragias retroorbitales. El plasma se tamizó mediante ELISA (como se describe más abajo), y se usaron ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-CADM1 para las fusiones. Los ratones se reforzaron intravenosamente con el antígeno 3 y 2 días antes del sacrificio y la eliminación del bazo. Típicamente, se realizaron 10-20 fusiones para cada antígeno. Se inmunizaron varias docenas de ratones para cada antígeno.

#### Selección de un animal HuMab Mouse<sup>®</sup> o KM Mouse<sup>®</sup> productor de anticuerpo Anti-CADM1

Para seleccionar un animal HuMab Mouse<sup>®</sup> o KM Mouse<sup>®</sup> que produce anticuerpos que unen CADM1, el suero de los ratones inmunizados se probó por ELISA como se describe por Fishwild, D. y otros (1996)(más arriba). En resumen, se recubrieron placas de microtitulación con CADM1 recombinante purificado a 1-2 µg /ml en PBS, se incubaron 50 µl/pocillos a 4°C durante toda la noche y después se bloquearon con 200 µl/pocillo de suero de pollo al 5% en PBS/Tween (0,05%). Se añadieron diluciones de plasma de ratones inmunizados con CADM1 a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y después se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc de IgG humano conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar, las placas se desarrollaron con sustrato ABTS (Moss Inc, producto: ABTS-1000) y se analizaron por espectrofotómetro a la DO 415-495. Se usaron ratones que desarrollaron los títulos más altos de anticuerpos anti-CADM1 para las fusiones. Se realizaron las fusiones como se describe más abajo y se probaron los sobrenadantes de hibridoma para la actividad anti-CADM1 mediante ELISA y FACS.

#### Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos para CADM1

Los esplenocitos de ratón, aislados de un HuMab mouse<sup>®</sup> y/o un KM mouse<sup>®</sup>, se fusionaron con una línea celular de mieloma de ratón usando electrofusión basada en campo eléctrico usando un electroporador de fusión Cyto Pulse de gran cámara (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD). En resumen, las suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se fusionaron a igual número de células de mieloma de ratón no secretor Sp2/0 (ATCC, CRL 1581). Las células se sembraron a una densidad de aproximadamente 2x10<sup>4</sup>/pocillo en placas de microtitulación de fondo plano, que se incubaron después en medio selectivo que contenía suero bovino fetal al 10%, medio condicionado P388D1 (ATCC, CRL TIB-63) al 10%, 3-5% origen (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con alto contenido de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio) más 5 mM de HEPES; 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mg/ml de gentamicina y HAT 1x (Sigma, CRL P-7185). Después de 1-2 semanas, las células se cultivaron en medio en el que el HAT se sustituyó con HT. Aproximadamente 10-14 días después de la siembra celular, los sobrenadantes de los pocillos individuales se examinaron primero para determinar si contenían anticuerpos g, k humanos. Los sobrenadantes que se puntuaron positivamente para g,k humano se tamizaron posteriormente por ELISA y FACS (descritos anteriormente) para anticuerpos IgG monoclonales humanos anti-CADM1. Los hibridomas secretores de anticuerpos se transfirieron a placas de 24 pocillos, se tamizaron de nuevo y, si todavía eran positivos para anticuerpos monoclonales IgG anti-CADM1 humanos, se subclonaron al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables se cultivaron después *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para caracterización adicional.

Los clones de hibridoma PTA021\_A1, PTA021\_A2, y PTA021 A3 generados de un KM Mouse<sup>®</sup>, se seleccionaron para un análisis posterior

#### Ejemplo 2: Caracterización Estructural de los Anticuerpos Monoclonales Humanos PTA021\_A1, PTA021\_A2 o PTA021\_A3

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales PTA021\_A1, PTA021\_A2, y PTA021\_A3 se obtuvieron de los hibridomas PTA021\_A1, PTA021\_A2, y PTA021\_A3, respectivamente, usando técnicas de PCR estándar y se secuenciaron usando técnicas estándar de secuenciación de ADN.

Las secuencias de anticuerpos pueden mutagenizarse para volver a los residuos germinales en uno o más residuos. Por ejemplo, la región variable de la cadena pesada de PTA021\_A1 puede mutagenizarse para reflejar la secuencia germinal en sitios específicos (p. ej., el residuo 30) para eliminar los sitios de glicosilación (p. ej., una mutación N30Q).

5 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de PTA021\_A1 se muestran en la Figura 1A y en las sec. con núm. de ident.:19 y 25, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de PTA021\_A1 se muestran en la Figura 1B y en las sec. con núm. de ident.:28 y 22, respectivamente.

10

La comparación de la secuencia de cadena pesada de la inmunoglobulina PTA021\_A1 con las secuencias conocidas de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena pesada de PTA021\_A1 utiliza un segmento de  $V_H$  de la línea germinal humana  $V_H$  2-05, un segmento D de la línea germinal humana 6-6, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 5b. La alineación de la secuencia de  $V_H$  de PTA021\_A1 con la secuencia de  $V_H$  2-05 de la línea germinal se muestra en la Figura 4. El análisis adicional de la secuencia de  $V_H$  de PTA021\_A1 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 1A y 4, y en las sec. con núms. de ident.:1, 4 y 7, respectivamente.

15

20

La comparación de la secuencia de cadena ligera de la inmunoglobulina PTA021\_A1 con las secuencias conocidas de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena ligera de PTA021\_A1 utiliza un segmento  $V_K$  de la línea germinal humana  $V_K$  L15 y un segmento JK de la línea germinal humana JK4. La alineación de la secuencia de  $V_K$  de PTA021\_A1 con la secuencia de  $V_K$  L15 germinal se muestra en la Figura 7. El análisis adicional de la secuencia de  $V_K$  de PTA021\_A1 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 1B y 7, y en las sec. con núms. de ident.:10, 13 y 16, respectivamente.

25

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de PTA021\_A2 se muestran en la Figura 2A y en las sec. con núm. de ident.:26 y 20, respectivamente.

30

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de PTA021\_A2 se muestran en la Figura 2B y en las sec. con núm. de ident.:29 y 23, respectivamente.

35

La comparación de la secuencia de cadena pesada de la inmunoglobulina PTA021\_A2 con las secuencias conocidas de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena pesada de PTA021\_A2 utiliza un segmento  $V_H$  de la línea germinal humana  $V_H$  2-05, un segmento D de la línea germinal humana 6-6, y un segmento JH de la línea germinal humana JH 5b. La alineación de la secuencia de  $V_H$  de PTA021\_A2 con la secuencia de  $V_H$  2-05 germinal se muestra en la Figura 5. El análisis adicional de la secuencia de  $V_H$  de PTA021\_A2 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 2A y 5, y en las sec. con núms. de ident.:2, 5 y 8, respectivamente.

40

La comparación de la secuencia de cadena ligera de la inmunoglobulina PTA021\_A2 con las secuencias conocidas de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena ligera de PTA021\_A2 utiliza un segmento  $V_K$  de la línea germinal humana  $V_K$  L15 y un segmento JK de la línea germinal humana JK4. La alineación de la secuencia de  $V_L$  de PTA021\_A2 con la secuencia de  $V_K$  L15 germinal se muestra en la Figura 8. El análisis adicional de la secuencia de  $V_K$  de PTA021\_A2 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 2B y 8, y en las sec. con núms. de ident.:11, 14 y 17, respectivamente.

45

50

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de PTA021\_A3 se muestran en la Figura 3A y en las sec. con núm. de ident.:27 y 21, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de PTA021\_A3 se muestran en la Figura 3B y en las sec. con núm. de ident.:30 y 24, respectivamente.

55

La comparación de la secuencia de cadena pesada de la inmunoglobulina PTA021\_A3 con las secuencias conocidas de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena pesada de PTA021\_A3 utiliza un segmento  $V_H$  de la línea germinal humana  $V_H$  2-05, un segmento D de la línea germinal humana 6-6 y un segmento JH de la línea germinal humana JH 5b. La alineación de la secuencia de  $V_H$  de PTA021\_A3 con la secuencia de  $V_H$  2-05 germinal se muestra en la Figura 6. El análisis adicional de la secuencia de  $V_H$  de PTA021\_A3 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en las Figuras 3A y 6, y en las sec. con núms. de ident.: 3, 6 y 9, respectivamente.

60

La comparación de la secuencia de cadena ligera de la inmunoglobulina PTA021\_A3 con las secuencias conocidas de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena ligera de PTA021\_A3 utiliza un segmento  $V_K$  de la línea germinal humana  $V_K$  L15 y un segmento JK de la línea germinal humana JK4. La alineación de

65

la secuencia de  $V_L$  de PTA021\_A3 con la secuencia de  $V_K$  L15 germinal se muestra en la Figura 9. Análisis adicional de la secuencia de  $V_L$  de PTA021\_A3 usando el sistema Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena ligera como se muestra en las Figuras 3B y 9, y en las sec. con núms. de ident.:12, 15, y 18, respectivamente.

5

Ejemplo 3: Caracterización de las propiedades de unión de los anticuerpos monoclonales CADM1 Estudios de citometría de flujo

10

En este ejemplo, la unión de los mAb PTA021\_A1, PTA021\_A2, PTA021\_A3 y la versión no fucosilada de PTA021\_A3 (NF) a CADM1 de la superficie celular se examinó mediante citometría de flujo.

15

Para probar la capacidad de los anticuerpos para unirse a la proteína CADM1 de la superficie celular, los anticuerpos se incubaron con diferentes células que expresan CADM1: NCI-H69 (Designación ATCC HTB-119<sup>TM</sup>), una línea celular humana de cáncer de pulmón de células pequeñas; DMS79 (Designación ATCC CRL-2049<sup>TM</sup>), una línea de cáncer de pulmón de células pequeñas humanas; SKOV3 (Designación ATCC HTB-77<sup>TM</sup>), una línea celular de cáncer de ovario humano; A549 (Designación ATCC CCL-185<sup>TM</sup>), una línea celular humana de cáncer de pulmón de células no pequeñas; SkMel28 (Designación ATCC HTB-72<sup>TM</sup>), una línea celular de melanoma humano 786-O (Designación ATCC CRL-1932<sup>TM</sup>), una línea celular de carcinoma de células renales humanas. Para los estudios de citometría de flujo, los anticuerpos monoclonales PTA021\_A1, PTA021\_A2, PTA021\_A3 y PTA021\_A3 (NF) se diluyeron con PBS 1x frío + BSA al 0,1% a 40 µg/ml. Para la reacción de unión, se añadió 50 µl de solución de anticuerpo diluido a 50 µl de suspensión celular que contenía  $4 \times 10^5$  células y la mezcla se incubó en hielo durante 30-60 minutos. Las células se lavaron después tres veces con PBS 1x + 0,1% de BSA. Se añadió una dilución 1:50 de fragmento F $\gamma$  F(ab)<sub>2</sub> de anti-IgG humano de cabra marcado con R-ficoeritrina (Jackson ImmunoResearch Labs, Núm. de catálogo 109-116-098) y la mezcla se incubó sobre hielo durante 1 hora, seguido de lavado dos veces con PBS 1x frío + BSA al 0,1%. Después del lavado final, se añadió 200 µl de PBS 1x frío + BSA al 0,1% a cada solución y se realizó el análisis de unión del anticuerpo mediante FACS.

20

25

La Figura 10 y la Tabla 1 más abajo muestran los resultados del análisis de citometría de flujo y la  $EC_{50}$  para la unión a la línea celular NCI-H69. Los resultados demuestran que los tres anticuerpos monoclonales se unen efectivamente al CADM 1 de la superficie celular.

Tabla 1: Unión de Anticuerpos Anti-CADM1 a Células que expresan CADM1 Humano

35

Anticuerpo	Células NCI-H69 $EC_{50}$ (nM)
PTA021_A1	0,588
PTA021_A2	0,667
PTA021_A3	0,6742

40

Las Figuras 11A y 11B muestran los resultados del análisis de citometría de flujo en las líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas NCI-H69 y DMS79.

45

La Figura 12 muestra los resultados del análisis de citometría de flujo del anticuerpo PTA021\_A3 en la línea celular de cáncer ovárico SKOV3.

La Figura 13 muestra los resultados del análisis por citometría de flujo del anticuerpo PTA021\_A3 en la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas A549.

50

La Figura 14 muestra los resultados del análisis de citometría de flujo del anticuerpo PTA021\_A3 en las líneas celulares de melanoma SkMel28 y de carcinoma de células renales 786-O.

Los resultados de las Figuras 11 a 14 demuestran que PTA021\_A3 se une efectivamente a CADM1 humano de la superficie celular en diferentes células que expresan CADM1.

55

La Figura 15 muestra los resultados del análisis por citometría de flujo de la versión no fucosilada de PTA021\_A3 (NF) en líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas NCI-H69 y DMS79. Estos resultados demuestran que la no fucosilación no afecta a la unión de PTA021\_A3 al CADM1 humano de la superficie celular.

60

Ejemplo 4 Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por mAbanti-CADM1

Para determinar la capacidad de los mAb anti-CADM1 para destruir las células que expresan CADM1 en presencia de células efectoras a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), se usaron dos líneas celulares, NCI-H69 y DMS79, como células objetivo.

65

Se prepararon células efectoras humanas a partir de sangre completa como sigue. Se purificaron células mononucleares de sangre periférica humana a partir de sangre completa heparinizada mediante separación estándar de Ficoll-paque. Las células se resuspendieron en medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% (inactivado por calor) y 200 U/ml de IL-2 humana y se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, las células se recogieron y lavaron cuatro veces en medio de cultivo y se resuspendieron a  $1 \times 10^7$  células/ml. Se prepararon las células objetivo incubando con reactivo BATDA (Perkin Elmer, Wellesley, MA) a 2,5 µl de BATDA por  $1 \times 10^6$  células objetivo/mL durante 20 minutos a 37° C. Las células objetivo se lavaron cuatro veces, se centrifugaron y se crecieron hasta un volumen final de  $1 \times 10^5$  células/ml.

Se probaron las células objetivo para ADCC específico de anticuerpo a los anticuerpos monoclonales anti-CADM1 humanos usando el análisis de emisión de fluorescencia de Delfia como sigue. Se incubaron las células NCI-H69 o DMS79 (100 µl de células objetivo marcadas,  $10^4$  células/pocillo) con 50 µl de células efectoras ( $10^6$  células/pocillo) y 50 µl de anticuerpo (10 µg/ml de concentración final). Se usó una relación objetivo a efector de 1:25 durante todos los experimentos. En todos los estudios, se usó un control de isotipo IgG1 humano como control negativo. Se centrifugaron las células a 2000 rpm y se incubaron durante una hora de incubación a 37° C. Los sobrenadantes se recogieron después, se sometieron a centrifugación y se transfirieron 20µl de sobrenadante a una placa de fondo plano, a la que se añadieron 180 µl de solución Eu (Perkin Elmer, Wellesley, MA) y se leyó en un lector de RubyStar (BMG Labtech). El % de lisis se calculó como sigue:  $(\text{liberación de la muestra} - \text{liberación espontánea} * 100) / (\text{liberación máxima} - \text{liberación espontánea})$ , donde la liberación espontánea es la fluorescencia de los pocillos que contienen células objetivo más células efectoras y liberación máxima es la fluorescencia de pocillos que contienen células objetivo y se han tratado con Triton-X al 2%.

Los resultados se resumen más abajo en la Tabla 2 y las Figuras 16A y 16B, que demuestran que PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3 son capaces de inducir específicamente ADCC en CADM1 que expresan las líneas celulares de cáncer.

Tabla 2. Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos mediada por los anticuerpos PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3

Anticuerpo	% de Lisis Específica: NCI-H69	% de Lisis Específica: DMS79
PTA021_A1	24,6 +/- 4,5	37,76 +/-7,8
PTA021_A2	15,9+/- 1,9	34,66 +/-3,1
PTA021_A3	29,8+/- 1,6	61,0 +/-1,5
Control de isotipo	3,3+/-4,6	2,96+/-1,9

#### Ejemplo 5: Internalización de Anticuerpo CADM1

Los anticuerpos monoclonales PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3 mostraron que se internalizan por las células NCI-H69 y DMS79 tras la unión a las células usando un ensayo Hum-Zap. El ensayo Hum-ZAP mostró la internalización de los anticuerpos monoclonales anti-CADM1 mediante la unión de un anticuerpo secundario anti-IgG humano conjugado con la toxina saporina. (Advanced Targeting System, San Diego, CA, IT-22-100). Primero, PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3 se unieron a la superficie de las células NCI-H69 o DMS79. Después, los anticuerpos Hum-ZAP se unieron a los anticuerpos primarios. A continuación, el complejo de anticuerpo primario/Hum-ZAP se internalizó por las células. La entrada de Saporin en las células resultó en la inhibición de la síntesis de proteínas y la muerte celular eventual.

El ensayo Hum-ZAP se llevó a cabo como sigue. Cada una de las células se sembró a una densidad de  $3 \times 10^3$  células por pocillo. Los anticuerpos monoclonales anti-CADM1 o una IgG humana de control del isotipo se diluyeron en serie y después se añadieron a las células. Después se añadió el Hum-ZAP a una concentración de 2 µg/ml y las placas se dejaron incubar durante 96 horas. La viabilidad celular en las placas se detectó mediante el kit CellTiter-Glo® de Ensayo de Viabilidad Celular Luminescente (Promega, G7571) y las placas se leyeron a 490 nM mediante un Luminomitor (Tuner BioSystems, Sunnyvale, CA). Los datos se analizaron por Prism (Graphpad). La muerte celular fue proporcional a la concentración de anticuerpos monoclonales PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3. Las Figuras 17A y 17B muestran que los anticuerpos monoclonales anti-CADM1 se internalizaron eficientemente por las células DMS79 y NCI-H69 respectivamente en comparación con el anticuerpo control de isotipo hIgG1.

#### Ejemplo 6: CADM1 se colocaliza con LAMP1

Se demostró que el anticuerpo monoclonal PTA021\_A3 se colocaliza con LAMP1 y, así, se interioriza. PTA021 A3 se unió a células NCI-H69, se lavó e incubó a 37 °C durante 45 minutos. El anticuerpo PTA021\_A3 se rastreó a través de un anticuerpo anti-humano marcado con FITC.

Algunas células se permeabilizaron y se tiñeron con LAMP1 antihumano, detectadas con un secundario marcado con TRITC.

Los resultados mostraron que PTA021\_A3 y LAMP1 se colocan en los endosomas

Ejemplo 7: Los anticuerpos anti-CADM1 se unen a los tejidos cancerosos

Se mostraron anticuerpos monoclonales anti-CADM1 PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3 que se unen a tejidos de cáncer humano que incluyen tejidos que representan cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de páncreas neuroendocrino, cáncer de hígado, carcinoides de pulmón y carcinoides gastrointestinales. Se obtuvieron biopsias de pacientes con cáncer y se usaron anticuerpos para tinción con inmunohistoquímica (Cytomyx, MA). Se usaron núcleos de tejidos de 5 µm. Después de secar durante 30 minutos en los portaobjetos, las secciones de tejido se fijaron con acetona a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se enjuagaron los portaobjetos en PBS y después se bloquearon con proteína libre de suero y bloqueador de peroxidasa (Dako S2001, CO) y posteriormente se incubaron con complejo de anticuerpo primario a 5µg /ml durante 45 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron los portaobjetos y se incubaron durante 30 minutos con anticuerpo secundario conjugado con FITC (Jackson Immunoresearch Lab, 109-097-003) y se lavaron de nuevo con PBS y se incubaron con conjugados de HRP poliméricos (Dako, CO, K4063) durante 20 minutos. Se usó cromógeno (Dako K3464) como sustrato, resultando en tinción marrón. Los portaobjetos se montaron en medios de montaje acuosos Faramount (Dako, S3025). Se demostró que PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3 se unen específicamente a células tumorales de los tipos listados anteriormente. Cuando se tiñen con estos anticuerpos monoclonales, otros órganos exhiben tinción negativa o no específica, que incluyen útero, pulmón, hígado, riñón, colon, cuello uterino, mama, médula ósea, cerebelo, cerebro, esófago, corazón, próstata, placenta, pituitaria, ovario, mesotelia, amígdala, piel, intestino delgado, músculo esquelético, estómago, bazo, timo y tiroides. Los datos demuestran que los HuMabs anti-CADM1 PTA021\_A1, PTA021\_A2 y PTA021\_A3 reconocen el CADM1 expresado en los tumores, que incluyen aquellos tumores de cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (que incluyen carcinomas escamosos y adenocarcinomas), cánceres neuroendocrinos (que incluyen los de páncreas, pulmón y tracto gastrointestinal), cáncer de hígado, carcinoides de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de riñón y carcinoides gastrointestinales.

La inmunohistoquímica del anticuerpo PTA021\_A3 en muestras de tejido de cáncer de pulmón de células pequeñas mostró una prevalencia del 75% de tinción de membrana de alto nivel (+++) de todas las células tumorales. La inmunohistoquímica en el anticuerpo PTA021\_A3 en muestras de tejido de cáncer de hígado mostró tinción positiva en 75%-95% de muestras con 45% de tumores que mostraban tinción de membrana de alto nivel (+++) de todas las células tumorales. Se llevaron a cabo estudios adicionales sobre PTA021\_A3 en conjuntos más pequeños de muestras de cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de ovario y carcinoma de células renales. La prevalencia de tinción positiva en carcinoma de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de mama y carcinoma de células claras fue ~66%; en el carcinoma de próstata y la prevalencia de carcinoma ovárico fue del 100% y el adenocarcinoma colorrectal mostró tinción positiva en el 17% de las muestras. Los tumores neuroendocrinos del pulmón, el páncreas y el tracto gastrointestinal además se probaron con muestras carcinoides pulmonares y neuroendocrinas pancreáticas que mostraron una prevalencia del 75% y los tumores neuroendocrinos del tracto gastrointestinal mostraron tinción positiva en el 65% de las muestras.

Ejemplo 8: Efecto de anticuerpos anti-CADM1 fucosilados y no fucosilados sobre el crecimiento de tumores de cáncer de hígado en un modelo de xenoinjerto de ratón

Se examinó el efecto de PTA021\_A3 y la versión no fucosilada de PTA021\_A3 (NF) sobre el crecimiento de células HepG2 derivadas del cáncer de hígado en un modelo de xenoinjerto de ratón. En este modelo de xenoinjerto, se implantaron ratones SCID (CB17, de Charles River Laboratories, Hollister, CA) con 2,5 x 10<sup>6</sup> células HepG2/ratón y las células HepG2 se dejaron crecer durante aprox. 30 días. Después, los ratones se asignaron al azar y se trataron por vía intraperitoneal (i.p.) como se indica en la Tabla 3:

Tabla 3. Protocolo de Inmunización para el Modelo de Xenoinjerto de Tumor HEPG2

	Dosis (Ab mg/kg)	Dosis Diaria
Vehículo		Día 0
Isotipo IgG1	10	Día 0, 4, 7, 11
Isotipo nf IgG1	10	Día 0, 4, 7, 11
CADM1 PTA021_A3 parental IgG1	10, 3	Día 0, 4, 7, 11
CADM1 PTA021_A3 nf IgG1	10, 3	Día 0, 4, 7, 11
Nexavar Sorafenib	20 (Q1Dx3), 10 p.o.	Q1Dx8, Día 0-7

El Nexavar Sorafenib, un inhibidor de quinasa múltiple de base química usado para tratar el carcinoma de células renales y cáncer de hígado, se usó como un control para la terapia dirigida.

5 Como se observa en la Figura 18, el tratamiento con los anticuerpos PTA021\_A3 y PTA021\_A3 NF reduce significativamente la velocidad de crecimiento del tumor, siendo el anticuerpo PTA021\_A3 NF no fucosilado el más potente.

Ejemplo 9: El conjugado anticuerpo anti-CADM1-fármaco inhibe el crecimiento de células HepG2 en un modelo de xenoinjerto de ratón

10

Se examinó el efecto de un conjugado PTA021\_A3 de conformidad con la fórmula M (denominado en lo sucesivo "conjugado PTA021\_A3-Fórmula A" o "PTA021\_A3-Fórmula M") sobre el crecimiento de células HepG2 derivadas de carcinoma hepatocelular en un modelo de xenoinjerto de ratón. En este modelo de xenoinjerto, se implantaron ratones SCID (CB17, de Charles River Laboratories, Hollister, CA) con  $2,5 \times 10^6$  células HepG2/ratón y las células HepG2 se dejaron crecer durante aprox. 30 días. Después se aleatorizaron los ratones y se trataron intraperitonealmente (i.p.) con conjugado PTA021\_A3-Fórmula M (0,1  $\mu\text{mol/kg}$ , o 0,03 $\mu\text{mol/kg}$ ). Se usó DT, y anticuerpo anti toxina de difteria, como un control de isotipo de no unión. El Nexavar Sorafenib, un inhibidor de quinasa múltiple de base química usado para tratar el carcinoma de células renales y cáncer de hígado, se usó como un control para la terapia dirigida.

15

20

Como se observa en la Figura 19, el tratamiento con el conjugado de PTA021\_A3-Fórmula M inhibe significativamente la velocidad de crecimiento del tumor de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 10: El conjugado anticuerpo anti-CADM1-fármaco inhibe el crecimiento de células DMS79 en un modelo de xenoinjerto de ratón

25

Se examinó el efecto de PTA021\_A3-Fórmula M en el crecimiento de células DMS79 derivadas de cáncer de pulmón de células pequeñas en un modelo de xenoinjerto de ratón. En este modelo de xenoinjerto, se implantaron ratones SCID (CB17, de Charles River Laboratories, Hollister, CA) con  $5 \times 10^6$  células DMS79 / ratón y se permitió que las células DMS79 crecieran hasta que el volumen medio del tumor fuera de aprox. 200  $\text{mm}^3$ . Después, los ratones se aleatorizaron y se trataron intraperitonealmente (i.p.) con conjugado de PTA021\_A3-Fórmula M en dos estudios.

30

Como se observa en la Figura 20A, el tratamiento con el conjugado PTA021\_A3-Fórmula M a 0,3  $\mu\text{mol/kg}$  provocó una regresión completa del tumor en todos los ratones durante todo el estudio (día 88). Como se observa en la Figura 20B, el tratamiento con el conjugado de PTA021\_A3-Fórmula M provocó la regresión del tumor a la dosis de 0,1  $\mu\text{mol/kg}$  a través del estudio que se completó al día 60. La dosis baja de 0,03 $\mu\text{mol/kg}$  provocó un retraso significativo en el crecimiento del tumor.

35

Ejemplo 11: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por PTA021\_A3 y PTA021\_A3 no fucosilado

40

Se usó un ensayo de citotoxicidad con fluorescencia para determinar la capacidad del mAAb anti-CADM1 PTA021\_A3 no fucosilado para destruir las células que expresan CADM1 en presencia de células efectoras mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC con células HepG2, 786-O y DMS79).

45

Se prepararon células efectoras humanas a partir de sangre completa como sigue. Se purificaron células mononucleares de sangre periférica humana a partir de sangre completa heparinizada mediante separación estándar de Ficoll-paque. Las células se resuspendieron en medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% (inactivado por calor) y 200 U/ml de IL-2 humana y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, las células se recogieron y lavaron cuatro veces en medio de cultivo y se resuspendieron a  $2 \times 10^7$  células/ml. Las células CHO-mesotelina objetivo se prepararon incubando con reactivo BATDA (Perkin Elmer, Wellesley, MA) a 2,5  $\mu\text{l}$  de BATDA por  $1 \times 10^6$  células objetivo/ml durante 20 minutos a 37° C. Las células objetivo se lavaron cuatro veces, se centrifugaron y se llevó a un volumen final de  $1 \times 10^5$  células/ml.

50

Las células HepG2, 786-O y DMS79 se probaron para ADCC específico de anticuerpo con el anticuerpo monoclonal PTA021\_A3 anti-CADM1 humano y la preparación no fucosilada de PTA021\_A3 usando el análisis de emisión de fluorescencia Delfia como sigue. Se incubaron HepG2, 786-O o DMS79 (100  $\mu\text{l}$  de células objetivo marcadas,  $10^4$  células/pocillo) con 50  $\mu\text{l}$  de células efectoras ( $10^6$  células/pocillo) y 50  $\mu\text{l}$  de anticuerpo (10  $\mu\text{g/ml}$  de concentración final). Se usó una relación objetivo a efector de 1:100 durante todos los experimentos. En todos los estudios, se usó un control de isotipo IgG1 humano como control negativo. Las células se centrifugaron a 2000 rpm y se incubaron durante una hora a 37° C. Los sobrenadantes se recogieron después, se sometieron a centrifugación y se transfirieron 20  $\mu\text{l}$  de sobrenadante a una placa de fondo plano, a la que se añadieron 180  $\mu\text{l}$  de solución Eu (Perkin Elmer, Wellesley, MA) y se leyó en un lector de RubyStar (BMG Labtech). El % de lisis se calculó como sigue: (liberación de la muestra - liberación espontánea \* 100) / (liberación máxima - liberación espontánea), donde la liberación espontánea es la fluorescencia de los pocillos que contienen células objetivo más células efectoras y liberación máxima es la fluorescencia de pocillos que contienen células objetivo y se han tratado con Triton-X al 2%.

60

65

Las Figuras 21, 22 y 23 muestran que PTA021\_A3 y PTA021\_A3 no fucosilado son capaces de provocar ADCC en células HepG2, 786-O y DMS79 y que el PTA021\_A3 no fucosilado es el anticuerpo más potente. El mismo efecto puede observarse en otras líneas celulares que expresan CADM1 tal como la línea SCLC NCI-H69.

5 Ejemplo 12: El anticuerpo anti-CADM1/cisplatino inhibe el crecimiento de células DMS79 en un modelo de xenoinjerto de ratón

10 Se examinó el efecto de PTA021\_A3 solo y en combinación con cisplatino sobre el crecimiento de células DMS79 derivadas de SCLC en un modelo de xenoinjerto de ratón. En este modelo de xenoinjerto, se implantaron ratones SCID (CB17, de Charles River Laboratories, Hollister, CA) con  $5 \times 10^6$  células DMS79 / ratón y las células DMS79 se dejaron crecer hasta que los tumores alcanzaron un promedio de 200 mm<sup>3</sup>. Después, los ratones se aleatorizaron y se trataron por vía intraperitoneal (i.p.) como se muestra en la gráfica de volumen tumoral.

15 Como se observa en la Figura 24, el tratamiento con PTA021\_A3 solo retarda el crecimiento del tumor y, en combinación con cisplatino, muestra una actividad antitumoral significativa y sinérgica

Ejemplo 13: Evaluación de la toxicidad de PTA021\_A3NF, PTA021\_A3 y PTA021\_A3-Fórmula M.

20 El perfil de toxicidad de los anticuerpos anti CADM1, que incluyen anticuerpos no fucosilados y conjugados anticuerpo-fármaco, se evalúan en macacos cynomolgus usando p. ej., PTA021\_A3 y sus derivados. Los resultados del ensayo IHC han demostrado que los monos cynomolgus y los humanos muestran patrones similares de expresión de CADM1 cuando se someten a IHC usando PTA021\_A3. Adicionalmente, la proteína CADM1 muestra alta identidad en cynos y humanos. Múltiples dosis IV entre p. ej. 0,1mg/kg y 100mg/kg se usan para determinar una dosis máxima tolerada para identificar las dosis adecuadas para los ensayos clínicos en humanos.

25 Se realizó un estudio exploratorio de toxicología sobre PTA021\_A3 y la versión no fucosilada de PTA021\_A3 (NF) en macacos cynomolgus. Se usaron 8 monos cynomolgus de cuatro años no vírgenes (virgen para los biólogos pero se habían previamente tratado en un estudio de farmacodinámica de molécula pequeña) en el estudio en dos grupos con dos machos y dos hembras en cada grupo. Los animales del Grupo 1 se trataron con el anticuerpo PTA021\_A3 (NF) no fucosilado en una sola dosis intravenosa (IV) a 1 mg/kg. Los animales del Grupo 2 se trataron con el anticuerpo PTA021\_A3 en una sola dosis IV a 1 mg/kg.

30 Las observaciones clínicas y la mortalidad/morbilidad se evaluaron dos veces al día am y pm. El peso corporal, la hematología y la química de la sangre se analizaron en los días -11, 0, 1, 3, 8, 15 y 22. Las evaluaciones de hematología incluyeron RBC, HGB, HCT, PLT, MCH, MCV, Reticulocitos, WBC y conteo diferencial. Las evaluaciones de la química de la sangre incluyeron AST, ALT, ALP, CRE, BUN, GLU, CHO, TP, ALB, TBIL, LDH, TG, Ca, P, A/G, K, Na y Cl.

35 No hubo observaciones manifiestas significativas (p. ej., comportamiento alimenticio) durante el estudio. No hubo efectos observables en los tejidos neuroendocrinos (p. ej. cambios hormonales que condujeran a cambios de comportamiento y signos de angustia). Tampoco hubo evidencia de dolor o temblor. Las Figuras 25 a 32 muestran que todos los análisis realizados estaban dentro de los valores esperados normales.

40 Las Figuras 25A y 25B muestran los datos de Peso Corporal para los monos machos y monos hembra respectivamente.

45 Las Figuras 26A y 26B muestran los datos de Glucosa para monos machos y monos hembra respectivamente.

50 Las Figuras 27A y 27B muestran los datos de Alanina Transaminasa para monos machos y monos hembra respectivamente.

55 Las Figuras 28A y 28B muestran los datos de Aspartato Transaminasa para monos machos y monos hembra respectivamente.

Las Figuras 29A y 29B muestran los datos de la Fosfatasa Alcalina para monos machos y monos hembra respectivamente.

Las Figuras 30A y 30B muestran los datos de Lactato Deshidrogenasa para monos machos y monos hembra respectivamente.

60 Las Figuras 31A y 31B muestran los datos de RBC para monos machos y monos hembra respectivamente.

Las Figuras 32A y 32B muestran los datos de WBC para monos machos y monos hembra respectivamente.

65

Ejemplo 14: Evaluación de la eficacia de PTA021\_A3NF, PTA021\_A3, y PTA021\_A3-Fórmula M.

5 Se ha demostrado que CADM1 se expresa en muchos tipos de cáncer por IHC usando el HuMAb PTA021\_A3. Se usan líneas celulares que representan modelos de tumor de cáncer para demostrar la eficacia de los anticuerpos anti CADM1 conjugados con toxina y desnudos para tratar diversos cánceres. Por ejemplo, PTA021\_A3 y sus derivados se usan solos o en combinación con estándares de cuidado en modelos de eficacia de cáncer renal (células 786-O), melanoma (células SkMel28) y cáncer de pulmón de células pequeñas (células DMS79) en las que se expresa CADM1. PTA021\_A3 y otros anticuerpos anti-CADM1 pueden usarse con modelos animales de xenoinjerto usando líneas celulares que expresan CADM1 que representan cánceres tales como cánceres neuroendocrinos, cáncer de colon, 10 cáncer de mama, cáncer de ovario y cáncer de próstata.

ES 2 639 026 T3

Resumen del listado de secuencias

	Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA	Sec. con núm. de ident.:	SECUENCIA
5	1	Aminoácidos de CDR1 de V <sub>H</sub> de PTA021 A1	23	Aminoácidos de VK de PTA021 A2
	2	Aminoácidos de CDR1 de V <sub>H</sub> de PTA021 A2	24	Aminoácidos de VK de PTA021 A3
10	3	Aminoácidos de CDR1 de V <sub>H</sub> de PTA021 A3	25	n.t. de V <sub>H</sub> de PTA021_A1
	4	Aminoácidos de CDR2 de V <sub>H</sub> de PTA021 A1	26	n.t. de V <sub>H</sub> de PTA021_A2
15	5	Aminoácidos de CDR2 de V <sub>H</sub> de PTA021 A2	27	n.t. de V <sub>H</sub> de PTA021_A3
	6	Aminoácidos de CDR2 de V <sub>H</sub> de PTA021 A3	28	n.t. de V <sub>K</sub> de PTA021_A1
20	7	Aminoácidos de CDR3 de V <sub>H</sub> de PTA021_A1	29	n.t. de V <sub>K</sub> de PTA021_A2
	8	Aminoácidos de CDR3 de V <sub>H</sub> de PTA021 A2	30	n.t. de V <sub>K</sub> de PTA021_A3
25	9	Aminoácidos de CDR3 de V <sub>H</sub> de PTA021 A3	31	Aminoácidos de V <sub>H</sub> 2-05 germinal
	10	Aminoácidos de CDR1 de V <sub>K</sub> de PTA021_A1	32	Aminoácidos de V <sub>H</sub> 2-05 germinal
30	11	Aminoácidos de CDR1 de V <sub>K</sub> de PTA021 A2	33	Aminoácidos de V <sub>H</sub> 2-05 germinal
	12	Aminoácidos de CDR1 de V <sub>K</sub> de PTA021 A3	34	Aminoácidos de V <sub>K</sub> L15 germinal
35	13	Aminoácidos de CDR2 de V <sub>K</sub> de PTA021_A1	35	Aminoácidos de V <sub>K</sub> L15 germinal
	14	Aminoácidos de CDR2 de V <sub>K</sub> de PTA021 A2	36	Aminoácidos de V <sub>K</sub> L15 germinal
40	15	Aminoácidos de CDR2 de V <sub>K</sub> de PTA021 A3	37	Aminoácidos de V <sub>H</sub> JH5b germinal
	16	Aminoácidos de CDR3 de V <sub>K</sub> de PTA021_A1	38	Aminoácidos de V <sub>H</sub> JH5b germinal
45	17	Aminoácidos de CDR3 de V <sub>K</sub> de PTA021 A2	39	Aminoácidos de V <sub>H</sub> JH5b germinal
	18	Aminoácidos de CDR3 de V <sub>K</sub> de PTA021 A3	40	Aminoácidos de JK4 germinal
50	19	Aminoácidos de V <sub>H</sub> de PTA021_A1	41	Aminoácidos de JK4 germinal
	20	V <sub>H</sub> aminoácido de PTA021_A2	42	Aminoácidos de JK4 germinal
55	21	V <sub>H</sub> aminoácido de PTA021_A3	43	Constructo de CADM1
	22	VK aminoácido de PTA021_A1	44	CADM1 ECD-6HIS
60			45	Péptido conjugado

65



ES 2 639 026 T3

<400> 5  
 Leu Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15  
 5  
 <210> 6  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 10  
 <400> 6  
 Leu Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15  
 15  
 <210> 7  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20  
 <400> 7  
 Arg Arg Val Glu Trp Val Ala Leu Ala Gly Asn Trp Phe Asp Pro  
 1 5 10 15  
 25  
 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 30  
 <400> 8  
 Arg Arg Val Glu Trp Phe Ala Leu Ala Gly Asn Trp Phe Asp Pro  
 1 5 10 15  
 35  
 <210> 9  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 40  
 <400> 9  
 Arg Arg Val Glu Trp Val Thr Leu Ala Gly Asn Trp Phe Asp Pro  
 1 5 10 15  
 45  
 <210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 50  
 <400> 10  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
 1 5 10  
 55  
 <210> 11  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 60  
 <400> 11  
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
 1 5 10



ES 2 639 026 T3

<400> 18  
 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

5 <210> 19  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 19  
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15

15 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Asn Thr Ser  
 20 25 30

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

25 Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
 50 55 60

30 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

35 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95

40 Cys Ala His Arg Arg Val Glu Trp Val Ala Leu Ala Gly Asn Trp Phe  
 100 105 110

45 Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

50 <210> 20  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 20

60

65



ES 2 639 026 T3

5 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala His Arg Arg Val Glu Trp Val Thr Leu Ala Gly Asn Trp Phe  
 100 105 110  
 10 Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

15 <210> 22  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 22  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

50 <210> 23  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 23

ES 2 639 026 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 5 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30  
 10 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45  
 15 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 20 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 25 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu  
 85 90 95  
 30 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105  
 <210> 24  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35 <400> 24  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 40 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 20 25 30  
 45 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 35 40 45  
 50 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 55 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 60 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu  
 85 90 95  
 65 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

ES 2 639 026 T3

<210> 25  
 <211> 375  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 25  
 cagatcacct tgaaggagtc tggctcctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60  
 acctgcacct tctctggggtt ctcaactcaat actagtggag tgggtgtggg ctggatccgt 120  
 10 cagccccag gaaaggecct ggagtggctt gcaactcattt attgggacga tgataagcgc 180  
 tacagcccat ctctgaagag caggctcacc atcaccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240  
 15 gtccttacia tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca catattactg tgcacacagg 300  
 agagttgaat gggtcgcctt ggcagggaaac tggttcgacc cctggggcca ggaaccctg 360  
 gtcaccgtct cctca 375  
 20  
 <210> 26  
 <211> 375  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 25  
 <400> 26  
 cagatcacct tgaaggagtc tggctcctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60  
 acctgcacct tctctggggtt ctcaactcagc actagtggag tgggtgtggg ctggatccgt 120  
 30 cagccccag gaaaggecct ggagtggctt gcaactcattt attgggatga tgataagcgc 180  
 tacagcccat ctctgaagag caggctcacc atcaccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240  
 35 gtccttacia tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca tatattactg tgcgcacagg 300  
 agagttgagt ggttcgcctt ggcagggaaac tggttcgacc cctggggcca gggatccctg 360  
 gtcaccgtct cctca 375  
 40  
 <210> 27  
 <211> 375  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 45  
 <400> 27  
 cagatcacct tgaaggagtc tggctcctacg ctggtgaaac ccacacagac cctcacgctg 60  
 acctgcacct tctctggggtt ctcaactcagt actagtggag tgggtgtggg ctggatccgt 120  
 50 cagccccag gaaaggecct ggagtggctt gcaactcattt attgggacga tgataagcgc 180  
 tacagcccat ctctgaagag caggctcacc atcaccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240  
 55 gtccttacia tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca catattactg tgcacacagg 300  
 agagttgagt gggtcaccct ggcagggaaac tggttcgacc cctggggcca ggaaccctg 360  
 60 gtcaccgtct cctca 375

ES 2 639 026 T3

<210> 28  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 28

	gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggtag cctggatca gcagaaacca	120
10	gagaaagccc ctaagtcct gatctatggt gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa cctgcagcct	240
15	gaagatthtg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctctcac tttcggcgga	300
	gggaccaagg tggagatcaa a	321

20 <210> 29  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

25

<400> 29

	gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggtag cctggatca gcagaaacca	120
30	gagaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
35	gaagatthtg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctctcac tttcggcgga	300
	gggaccaagg tggagatcaa a	321

40 <210> 30  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

45

<400> 30

	gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
	atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggtag cctggatca gcagaaacca	120
50	gagaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
	aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa cctgcagcct	240
55	gaagatthtg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctctcac tttcggcgga	300
	gggaccaagg tggagatcaa a	321

60 <210> 31  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 31

65



ES 2 639 026 T3

<210> 33  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 33

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

10

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30

15

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

20

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser  
 50 55 60

25

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80

30

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala His Arg  
 100

<210> 34  
 <211> 95  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

35

<400> 34

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

45

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

50

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

55

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

60

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

65

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

ES 2 639 026 T3

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

<400> 35

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

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

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

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

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

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

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

<400> 36

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

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

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

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

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

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

ES 2 639 026 T3

<210> 37  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 37  
**Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10 15**

<210> 38  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15  
 <400> 38  
**Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10 15**

<210> 39  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25  
 <400> 39  
**Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser**  
**1 5 10 15**

<210> 40  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35  
 <400> 40  
**Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys**  
**1 5 10**

<210> 41  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45  
 <400> 41  
**Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys**  
**1 5 10**

<210> 42  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55  
 <400> 42  
**Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys**  
**1 5 10**

<210> 43  
 <211> 387  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 65

ES 2 639 026 T3

<400> 43

1 Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu  
 5                                   5                                   10                                   15  
 20 Ala Gln Asn Leu Phe Thr Lys Asp Val Thr Val Ile Glu Gly Glu Val  
                                  20                                   25                                   30  
 35 Ala Thr Ile Ser Cys Gln Val Asn Lys Ser Asp Asp Ser Val Ile Gln  
                                  35                                   40                                   45  
 50 Leu Leu Asn Pro Asn Arg Gln Thr Ile Tyr Phe Arg Asp Phe Arg Pro  
                  50                                   55                                   60  
 65 Leu Lys Asp Ser Arg Phe Gln Leu Leu Asn Phe Ser Ser Ser Glu Leu  
                                  70                                   75                                   80  
 80 Lys Val Ser Leu Thr Asn Val Ser Ile Ser Asp Glu Gly Arg Tyr Phe  
                                  85                                   90                                   95  
 100 Cys Gln Leu Tyr Thr Asp Pro Pro Gln Glu Ser Tyr Thr Thr Ile Thr  
                                  100                                   105                                   110  
 115 Val Leu Val Pro Pro Arg Asn Leu Met Ile Asp Ile Gln Lys Asp Thr  
                                  115                                   120                                   125  
 130 Ala Val Glu Gly Glu Glu Ile Glu Val Asn Cys Thr Ala Met Ala Ser  
                                  130                                   135                                   140  
 145 Lys Pro Ala Thr Thr Ile Arg Trp Phe Lys Gly Asn Thr Glu Leu Lys  
                                  145                                   150                                   155                                   160  
 165 Gly Lys Ser Glu Val Glu Glu Trp Ser Asp Met Tyr Thr Val Thr Ser  
                                  165                                   170                                   175  
 180 Gln Leu Met Leu Lys Val His Lys Glu Asp Asp Gly Val Pro Val Ile  
                                  180                                   185                                   190  
 195 Cys Gln Val Glu His Pro Ala Val Thr Gly Asn Leu Gln Thr Gln Arg  
                                  195                                   200                                   205  
 210 Tyr Leu Glu Val Gln Tyr Lys Pro Gln Val His Ile Gln Met Thr Tyr  
                                  210                                   215                                   220  
 225 Pro Leu Gln Gly Leu Thr Arg Glu Gly Asp Ala Leu Glu Leu Thr Cys  
                                  225                                   230                                   235                                   240  
 245 Glu Ala Ile Gly Lys Pro Gln Pro Val Met Val Thr Trp Val Arg Val  
                                  245                                   250                                   255  
 260 Asp Asp Glu Met Pro Gln His Ala Val Leu Ser Gly Pro Asn Leu Phe  
                                  260                                   265                                   270



ES 2 639 026 T3

Cys Gln Leu Tyr Thr Asp Pro Pro Gln Glu Ser Tyr Thr Thr Ile Thr  
 100 105 110  
 5 Val Leu Val Pro Pro Arg Asn Leu Met Ile Asp Ile Gln Lys Asp Thr  
 115 120 125  
 10 Ala Val Glu Gly Glu Glu Ile Glu Val Asn Cys Thr Ala Met Ala Ser  
 130 135 140  
 15 Lys Pro Ala Thr Thr Ile Arg Trp Phe Lys Gly Asn Thr Glu Leu Lys  
 145 150 155 160  
 Gly Lys Ser Glu Val Glu Glu Trp Ser Asp Met Tyr Thr Val Thr Ser  
 165 170 175  
 20 Gln Leu Met Leu Lys Val His Lys Glu Asp Asp Gly Val Pro Val Ile  
 180 185 190  
 25 Cys Gln Val Glu His Pro Ala Val Thr Gly Asn Leu Gln Thr Gln Arg  
 195 200 205  
 30 Tyr Leu Glu Val Gln Tyr Lys Pro Gln Val His Ile Gln Met Thr Tyr  
 210 215 220  
 35 Pro Leu Gln Gly Leu Thr Arg Glu Gly Asp Ala Leu Glu Leu Thr Cys  
 225 230 235 240  
 40 Glu Ala Ile Gly Lys Pro Gln Pro Val Met Val Thr Trp Val Arg Val  
 245 250 255  
 45 Asp Asp Glu Met Pro Gln His Ala Val Leu Ser Gly Pro Asn Leu Phe  
 260 265 270  
 Ile Asn Asn Leu Asn Lys Thr Asp Asn Gly Thr Tyr Arg Cys Glu Ala  
 275 280 285  
 50 Ser Asn Ile Val Gly Lys Ala His Ser Asp Tyr Met Leu Tyr Val Tyr  
 290 295 300  
 55 Asp Ser Arg Ala Gly Glu Glu Gly Ser Ile Arg Ala Val Asp Ala Ser  
 305 310 315 320  
 His His His His His His  
 325

<210> 45

<211> 5

60 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido conjugado

65 <400> 45

Pro Val Gly Val Val  
1 5

5

## Reivindicaciones

1. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, o un fragmento de anticuerpo que se une a un epítipo en CADM1 humano y comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 19, 20 o 21 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la sec. con núm. de ident.: 22, 23, o 24.
2. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, o un fragmento de anticuerpo que se une a un epítipo en CADM1 humano y que comprende:
- (a) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 1, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 4, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 7, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 10, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 13, y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 16;
- o
- (b) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 2, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 5, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 8, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 11, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 14, y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 17;
- o
- (c) una CDR1 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 3, una CDR2 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 6, una CDR3 de la región variable de la cadena pesada que comprende la sec. con núm. de ident.: 9, una CDR1 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 12, una CDR2 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 15, y una CDR3 de la región variable de la cadena ligera que comprende la sec. con núm. de ident.: 18.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o la reivindicación 2:
- (A) en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa de un isotipo IgG1 IgG2, IgG3, o IgG4;
- (B) en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo modificado genéticamente que resulta en un aumento de la unión a receptores Fc y/o aumento de la potencia para ADCC, y un anticuerpo biespecífico;
- (C) en donde el anticuerpo que se conjuga con un agente terapéutico, preferentemente en donde el agente terapéutico es una citotoxina o un isótopo radiactivo; o
- (D) en donde dicho anticuerpo se une al CADM1 humano con una  $EC_{50}$  en el intervalo de <50 nM, preferentemente en donde dicho anticuerpo se une al CADM1 humano con una  $EC_{50}$  en el intervalo de <10 nM, y con mayor preferencia en donde dicho anticuerpo se une al CADM1 humano con una  $EC_{50}$  en el intervalo de < 1 nM.
4. Una composición que comprende el anticuerpo aislado, porción de unión a antígeno o fragmento de anticuerpo que se une a un epítipo en CADM1 humano de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y un portador farmacéuticamente aceptable.
5. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o ligera del anticuerpo o porción de unión a antígeno o fragmento de anticuerpo que se une a un epítipo en CADM1 humano de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2; o un vector de expresión que comprende dicha molécula de ácido nucleico; o una célula huésped que comprende dicho vector de expresión.
6. Un método para preparar un anticuerpo anti-CADM1, dicho método comprende las etapas de:
- obtener una célula huésped que contiene una o más moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2;
- cultivar la célula huésped en un cultivo de células huésped;
- proporcionar condiciones de cultivo de las células huésped en donde se expresan una o más moléculas de ácido nucleico; y recuperar el anticuerpo a partir de la célula huésped o del cultivo de células huésped.
7. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión a antígeno de este, o un fragmento de anticuerpo como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para usar en un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada con células objetivo que expresan CADM1, preferentemente en donde dicha enfermedad

- es un cáncer humano, y con mayor preferencia en donde dicho cáncer humano se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de pulmón de células pequeñas, leucemia de células T adultas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (que incluyen carcinomas escamosos y adenocarcinomas), melanoma, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cánceres neuroendocrinos que incluyen los de pulmón, suprarrenal, pituitaria, tracto GI, riñón, hígado (que incluyen carcinomas hepatocelulares), páncreas (que incluyen insulinosomas y glucagonomas), glioblastomas y tumores carcinoides, que incluyen los del páncreas, pulmón, tracto GI, hígado y riñón.
- 5
8. Un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de unión a antígeno de este, o un fragmento de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que se une a un epítipo en CADM1 humano y comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en:  
 la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada expuesta en la sec. con núm. de ident.: 19 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera expuesta en la sec. con núm. de ident.: 22;  
 la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada expuesta en la sec. con núm. de ident.: 20 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera expuesta en la sec. con núm. de ident.: 23; y  
 la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada expuesta en la sec. con núm. de ident.: 21 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera expuesta en la sec. con núm. de ident.: 24.
- 10
- 15
- 20
9. El anticuerpo aislado de conformidad con la reivindicación 8:  
 en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo de cadena simple, un anticuerpo modificado genéticamente que resulta en el aumento de la unión a los receptores Fc y/o aumento de la potencia para ADCC, y un anticuerpo biespecífico.
- 25
10. Una composición que comprende el anticuerpo aislado o porción de unión a antígeno de este de conformidad con la reivindicación 8 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30
11. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la cadena pesada o ligera del anticuerpo aislado o porción de unión a antígeno de este de conformidad con la reivindicación 8; o un vector de expresión que comprende dicha molécula de ácido nucleico; o una célula huésped que comprende dicho vector de expresión.
- 35
12. Un hibridoma que expresa el anticuerpo o porción de unión a antígeno o fragmento de anticuerpo que se une a un epítipo en CADM1 humano de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 8.
- 40
13. Un método para preparar el anticuerpo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 8, que comprende las etapas de:  
 inmunizar un animal transgénico que comprende genes de inmunoglobulina humana con un péptido CADM1;  
 recuperar las células B a partir de dicho animal transgénico;  
 producir hibridomas a partir de dichas células B;  
 seleccionar hibridomas que expresan anticuerpos que se unen a CADM1; y  
 recuperar dichos anticuerpos que se unen a CADM1 a partir de dichos hibridomas seleccionados.
- 45
14. Un método para producir anticuerpos anti-CADM1, que comprende las etapas de:  
 inmunizar un animal transgénico que comprende genes de inmunoglobulina humana con un péptido CADM1;  
 recuperar el ARNm a partir de las células B de dicho animal transgénico;  
 convertir dicho ARNm a ADNc;  
 expresar dicho ADNc en fagos de manera que los anticuerpos anti-CADM1 codificados por dicho ADNc se presenten en la superficie de dichos fagos;  
 seleccionar los fagos que presentan los anticuerpos anti-CADM1;  
 recuperar las moléculas de ácido nucleico a partir de dichos fagos seleccionados que codifican dichas inmunoglobulinas anti-CADM1;  
 expresar dichas moléculas de ácido nucleico recuperadas en una célula huésped; y  
 recuperar los anticuerpos según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 8 a partir de dicha célula huésped que se unen a CADM1.
- 50
- 55
- 60
15. Un inmunocombinado que comprende (i) un anticuerpo aislado como se reivindica en la reivindicación 8 o la reivindicación 9 y (ii) un agente terapéutico.

**VH de PTA021\_ A1 Anti-CADM1**

Segmento V: 2-05  
 Segmento D: 6-6  
 Segmento J: JH5b

```

      Q I T L K E S G P T L V K P T Q T L
1  CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT GGT CCT ACG CTG GTG AAA CCC ACA CAG ACC CTC

                                     CDR1
                                     -----
      T L T C T F S G F S L H T S G V G V
55 ACG CTG ACC TGC ACC TTC TCT GGG TTC TCA CTC AAT ACT AGT GGA GTG GGT GTG

    CDR1                                     CDR2
    ---                                     -----
      G W I R Q P P G K A L E W L A L I Y
109 GGC TGG ATC CGT CAG CCC CCA GGA AAG GCC CTG GAG TGG CTT GCA CTC ATT TAT

                                     CDR2
                                     -----
      W D D D K R Y S P S L K S R L T I T
163 TGG GAC GAT GAT AAG CGC TAC AGC CCA TCT CTG AAG AGC AGG CTC ACC ATC ACC

      K D T S K H Q V V L T M T H M D P V
217 AAG GAC ACC TCC AAA AAC CAG GTG GTC CTT ACA ATG ACC AAC ATG GAC CCT GTG

                                     CDR3
                                     -----
      D T A T Y Y C A H R R V E W V A L A
271 GAC ACA GCC ACA TAT TAC TGT GCA CAC AGG AGA GTT GAA TGG GTC GCC CTG GCA

    CDR3
    -----
      G N W F D P W G Q G T L V T V S S
325 GGG AAC TGG TTC GAC CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

**FIGURA 1A**

**VK de PTA021\_A1 Anti-CADM1**

Segmento V : L15

Segmento J : JK4

```

      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
1  GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
      V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
55  GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
      Q Q K P E K A P K S L I Y G A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GGT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
      Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L T I S H L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AAC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      -----
      Y H S Y P L T F G G G T K V E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

**FIGURA 1B**

**VH de PTA021\_ A2 Anti-CADM1**

Segmento V: 2-05  
 Segmento D: 6-6  
 Segmento J: JH5b

```

      Q I T L K E S G P T L V K P T Q T L
1  CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT GGT CCT ACG CTG GTG AAA CCC ACA CAG ACC CTC

                                     CDR1
                                     -----
      T L T C T F S G F S L S T S G V G V
55 ACG CTG ACC TGC ACC TTC TCT GGG TTC TCA CTC AGC ACT AGT GGA GTG GGT GTG

CDR1                                     CDR2
---                                     -----
      G W I R Q P P G K A L E W L A L I Y
109 GGC TGG ATC CGT CAG CCC CCA GGA AAG GCC CTG GAG TGG CTT GCA CTC ATT TAT

                                     CDR2
                                     -----
      W D D D K R Y S P S L K S R L T I T
163 TGG GAT GAT GAT AAG CGC TAC AGC CCA TCT CTG AAG AGC AGG CTC ACC ATC ACC

      K D T S K H Q V V L T M T H M D P V
217 AAG GAC ACC TCC AAA AAC CAG GTG GTC CTT ACA ATG ACC AAC ATG GAC CCT GTG

                                     CDR3
                                     -----
      D T A I Y Y C A H R R V E W F A L A
271 GAC ACA GCC ATA TAT TAC TGT GCG CAC AGG AGA GTT GAG TGG TTC GCC CTG GCA

      CDR3
      -----
      G H W F D P W G Q G S L V T V S S
325 GGG AAC TGG TTC GAC CCC TGG GGC CAG GGA TCC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

**FIGURA 2A**

**VK de PTA021\_ A2 Anti-CADM1**

Segmento V : L15

Segmento J : JK4

```

      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
1  GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
      V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
      Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
      Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      -----
      Y H S Y P L T F G G G T K V E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

**FIGURA 2B**

**VH de PTA021\_ A3 Anti-CADM1**

Segmento V: 2-05  
 Segmento D: 6-6  
 Segmento J: JH5b

```

      Q I T L K E S G P T L V K P T Q T L
1  CAG ATC ACC TTG AAG GAG TCT GGT CCT ACG CTG GTG AAA CCC ACA CAG ACC CTC

                                     CDR1
                                     -----
      T L T C T F S G F S L S T S G V G V
55  ACG CTG ACC TGC ACC TTC TCT GGG TTC TCA CTC AGT ACT AGT GGA GTG GGT GTG

    CDR1                                     CDR2
    ---                                     -----
      G W I R Q P P G K A L E W L A L I Y
109 GGC TGG ATC CGT CAG CCC CCA GGA AAG GCC CTG GAG TGG CTT GCA CTC ATT TAT

                                     CDR2
                                     -----
      W D D D K R Y S P S L K S R L T I T
163 TGG GAC GAT GAT AAG CGC TAC AGC CCA TCT CTG AAG AGC AGG CTC ACC ATC ACC

      K D T S K H Q V V L T M T H M D P V
217 AAG GAC ACC TCC AAA AAC CAG GTG GTC CTT ACA ATG ACC AAC ATG GAC CCT GTG

                                     CDR3
                                     -----
      D T A T Y Y C A H R R V E W V T L A
271 GAC ACA GCC ACA TAT TAC TGT GCA CAC AGG AGA GTT GAG TGG GTC ACC CTG GCA

    CDR3
    -----
      G H W F D P W G Q G T L V T V S S
325 GGG AAC TGG TTC GAC CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
    
```

**FIGURA 3A**

**VK de PTA021\_ A3 Anti-CADM1**

Segmento V : L15

Segmento J : JK4

```

      D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
1  GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

                                CDR1
                                -----
      V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

                                CDR2
                                -----
      Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

      CDR2
      -----
      Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

                                CDR3
                                -----
      L T I S H L Q P E D F A T Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AAC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG

      CDR3
      -----
      Y N S Y P L T F G G G T K V E I K
271 TAT AAT AGT TAC CCT CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
    
```

**FIGURA 3B**

**VH de PTA021\_ A1 Anti-CADM1**

<p>Germinal 2-05 VH de PTA021_A1</p>	<p>Q I T L K E S G P T L V K P T Q T L - - - - -</p>
<p>Germinal 2-05 VH de PTA021_A1</p>	<p>T L T C T F S G F S L S T S G V G V - - - - - <u>CDR1</u> - - - - -</p>
<p>Germinal 2-05 VH de PTA021_A1</p>	<p>G W I R Q P P G K A L E W L A L I Y - - - - - <u>CDR2</u> - - - - -</p>
<p>Germinal 2-05 VH de PTA021_A1</p>	<p>W N D D K R Y S P S L K S R L T I T - D - - - - - <u>CDR2</u> - - - - -</p>
<p>Germinal 2-05 VH de PTA021_A1</p>	<p>K D T S K N Q V V L T M T N M D P V - - - - -</p>
<p>Germinal 2-05 VH de PTA021_A1</p>	<p>D T A T Y Y C A H R - - - - - <u>CDR3</u> - - - - - R V E W V A L A</p>
<p>Germinal JH5b VH de PTA021_A1</p>	<p>N W F D P W G Q G T L V T V S S G - - - - -</p>

**FIGURA 4**

**VH de PTA021\_ A2 Anti-CADM1**

Germinal 2-05 VH de PTA021_A2	Q I T L K E S G P T L V K P T Q T L - - - - -
Germinal 2-05 VH de PTA021_A2	T L T C T F S G F S L S T S G V G V - - - - - <u>CDR1</u>
Germinal 2-05 VH de PTA021_A2	G W I R Q P P G K A L E W L A L I Y - - - - - <u>CDR2</u>
Germinal 2-05 VH de PTA021_A2	W N D D K R Y S P S L K S R L T I T - D - - - - - <u>CDR2</u>
Germinal 2-05 VH de PTA021_A2	K D T S K N Q V V L T M T N M D P V - - - - -
Germinal 2-05 VH de PTA021_A2	D T A T Y Y C A H R - - - I - - - - - <u>CDR3</u> R V E W F A L A
Germinal JH5b VH de PTA021_A2	N W F D P W G Q G T L V T V S S G - - - - - <u>CDR3</u> S - - - - -

**FIGURA 5**

**VH de PTA021\_ A3 Anti-CADM1**

<p>Germinal 2-05 VH de PTA021_A3</p>	<p>Q I T L K E S G P T L V K P T Q T L - - - - -</p>
<p>Germinal 2-05 VH de PTA021_A3</p>	<p>T L T C T F S G F S L S T S G V G V - - - - - <u>CDR1</u> - - - - -</p>
<p>Germinal 2-05 VH de PTA021_A3</p>	<p>G W I R Q P P G K A L E W L A L I Y - - - - - <u>CDR2</u> - - - - -</p>
<p>Germinal 2-05 VH de PTA021_A3</p>	<p>W N D D K R Y S P S L K S R L T I T <u>CDR2</u> - D - - - - -</p>
<p>Germinal 2-05 VH de PTA021_A3</p>	<p>K D T S K N Q V V L T M T N M D P V - - - - -</p>
<p>Germinal 2-05 VH de PTA021_A3</p>	<p>D T A T Y Y C A H R - - - - - <u>CDR3</u> - - - - - - - - - - R V E W V T L A</p>
<p>Germinal JH5b VH de PTA021_A3</p>	<p>N W F D P W G Q G T L V T V S S <u>CDR3</u> G - - - - -</p>

**FIGURA 6**

**VK de PTA021\_ A1 Anti-CADM1**

<p><u>CDR1</u>  <b>Germinal L15</b>                  S Q G I S S  <b>VK de PTA021_ A1</b>                  - - - - -</p>	<p>D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A                  - - - - -</p>
<p><b>Germinal L15</b>                  G V P S R F  <b>VK de PTA021_ A1</b>                  - - - - -</p>	<p><u>CDR2</u>                  W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S                  - - - - - G - - - - -</p>
<p><u>CDR3</u>  <b>Germinal L15</b>                  C Q Q Y N S  <b>VK de PTA021_ A1</b>                  - - - - -</p>	<p>S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y                  - - - - - N - - - - -</p>
<p><b>Germinal L15</b>  <b>Germinal JK4</b>  <b>VK de PTA021_ A1</b>                  - - - - -</p>	<p><u>Y P</u>                  L T F G G G T K V E I K                  - - - - -</p>

**FIGURA 7**

**VK de PTA021\_ A2 Anti-CADM1**

<p><u>CDR1</u>  <b>Germinal L15</b>                  S Q G I S S  <b>VK de PTA021_A2</b>                  - - - - -</p>	<p>D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A                  - - - - -</p>
<p><b>Germinal L15</b>                  G V P S R F  <b>VK de PTA021_A2</b>                  - - - - -</p>	<p><u>CDR2</u>                  W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S                  - - - - -</p>
<p><u>CDR3</u>  <b>Germinal L15</b>                  C Q Q Y N S  <b>VK de PTA021_A2</b>                  - - - - -</p>	<p>S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y                  - - - - -</p>
<p><b>Germinal L15</b>  <b>Germinal JK4</b>  <b>VK de PTA021_A2</b></p>	<p><u>Y P</u>                  L T F G G G T K V E I K                  - - - - -</p>

**FIGURA 8**

VK de PTA021\_A3 Anti-CADM1

<p><u>CDR1</u>                  Germinal L15                  S Q G I S S                  VK de PTA021_A3                  - - - - -</p>	<p>D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A                  - - - - -</p>
<p>Germinal L15                  G V P S R F                  VK de PTA021_A3                  - - - - -</p>	<p><u>CDR2</u>                  W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S                  - - - - -</p>
<p><u>CDR3</u>                  Germinal L15                  C Q Q Y N S                  VK de PTA021_A3                  - - - - -</p>	<p>S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y                  - - - - - N - - - - -</p>
<p>Germinal L15                  Germinal JK4                  VK de PTA021_A3</p>	<p><u>Y P</u>                  L T F G G G C K V E I K                  - - - - -</p>

FIGURA 9

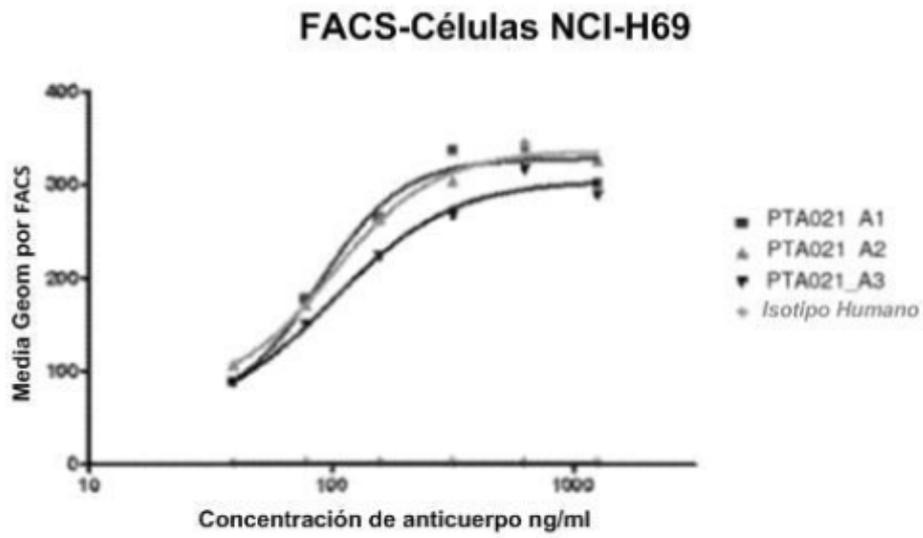


FIGURA 10

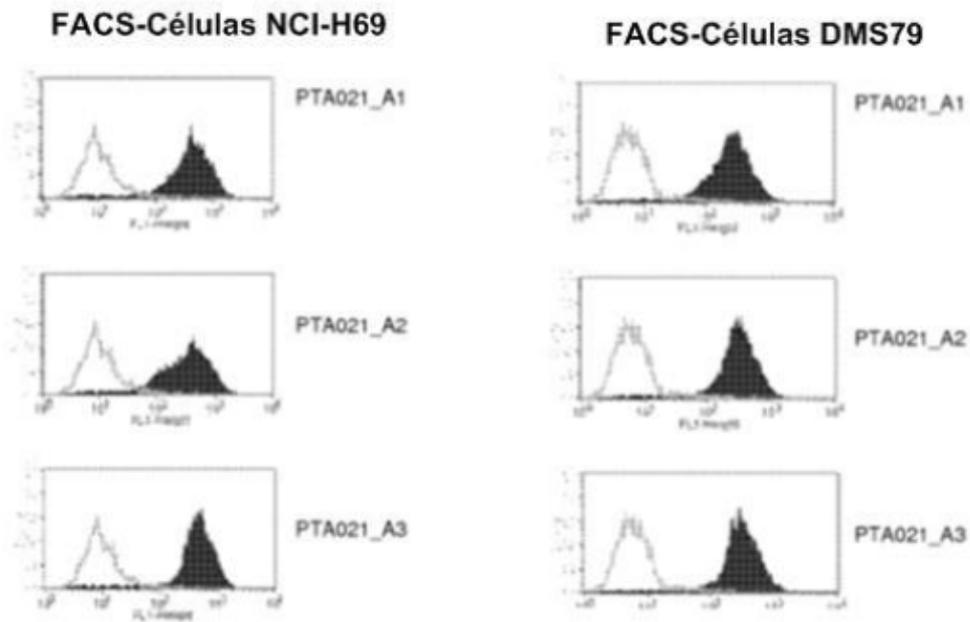


FIGURA 11A

FIGURA 11B

### FACS: Células SKOV3

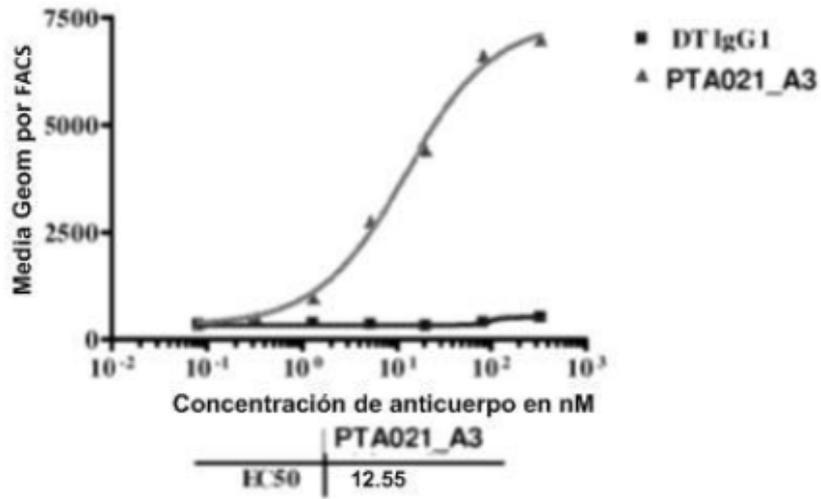


FIGURA 12

### FACS: Células A549

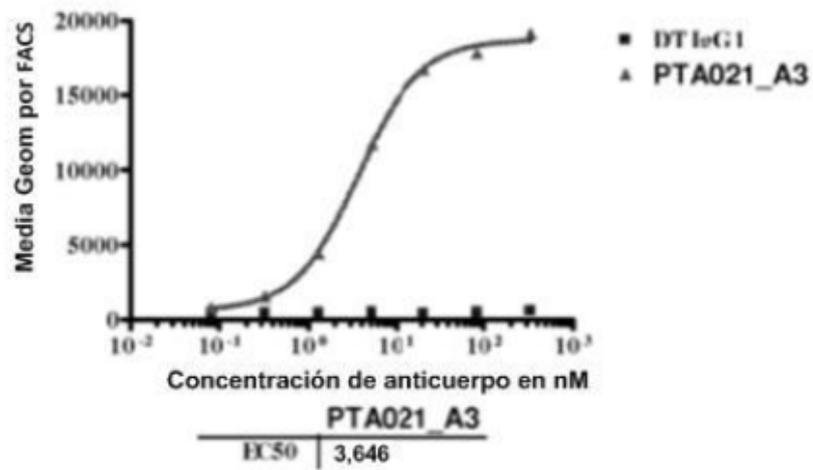
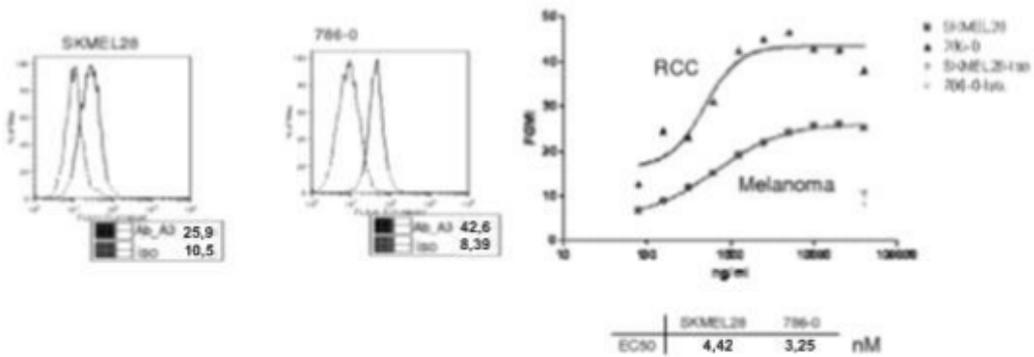


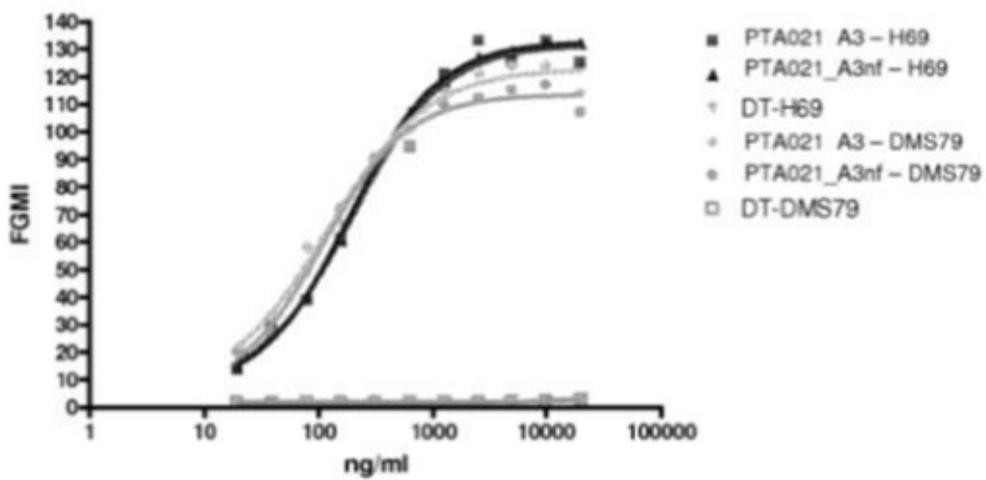
FIGURA 13

**FACS: Líneas celulares 786-O, RCC y SkMel28, Melanoma**



**FIGURA 14**

**FACS:PTA021\_A3(NF) en células NCI-H69 y DMS79**



**FIGURA 15**

Células DMS79, E/T 25:1, Abs @ 10ug/ml

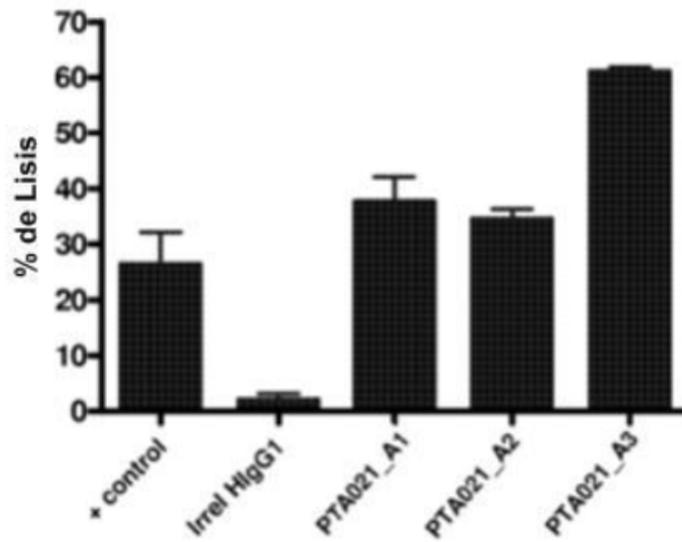


FIGURA 16A

Células NCI-H69, E/T 25:1, Abs @ 10ug/ml

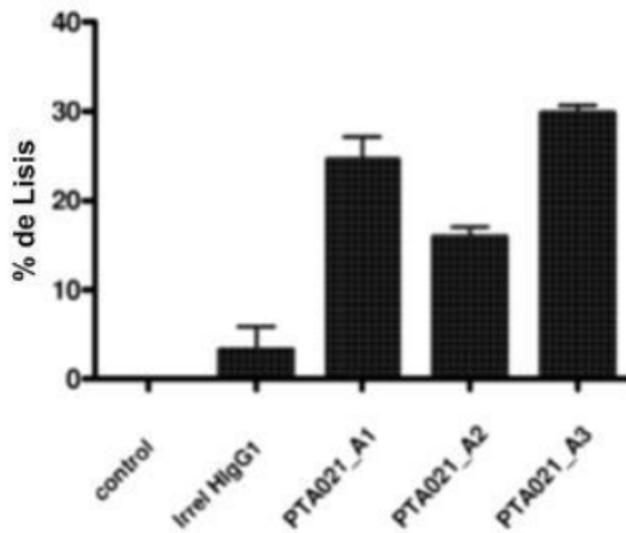


FIGURA 16B

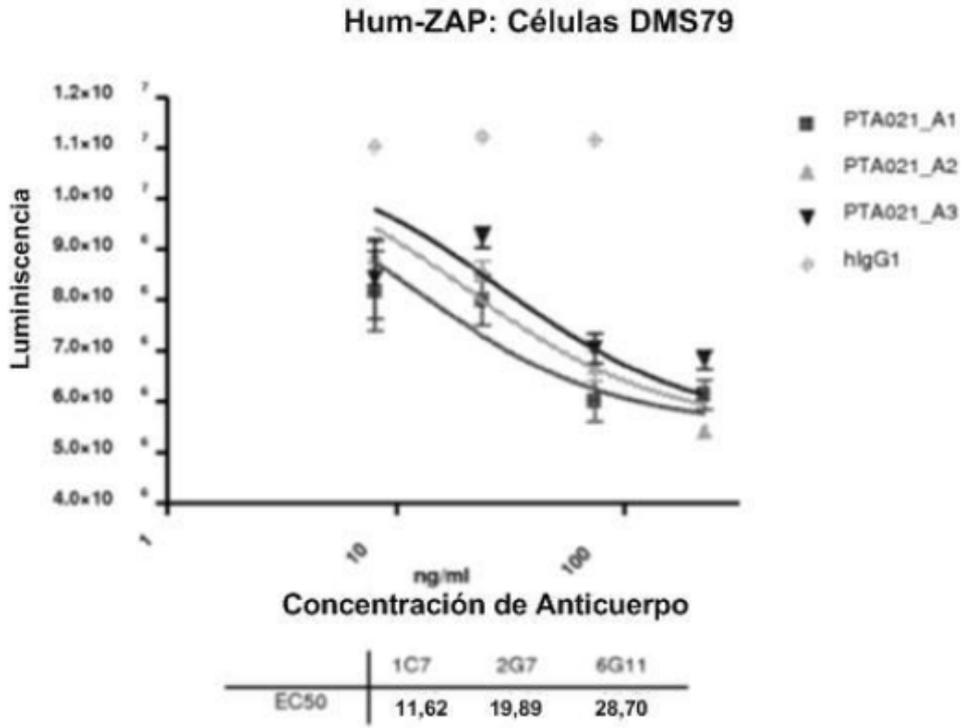


FIGURA 17A

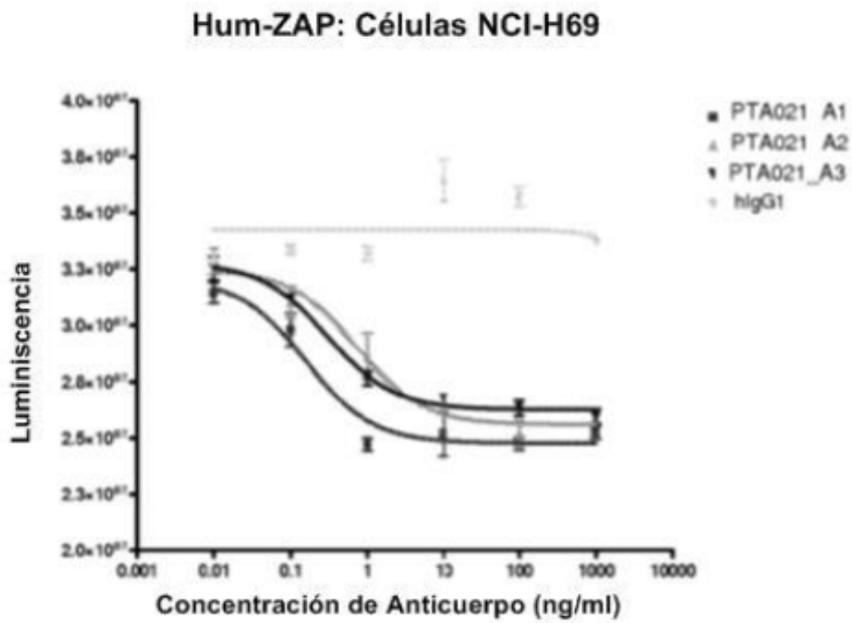


FIGURA 17B

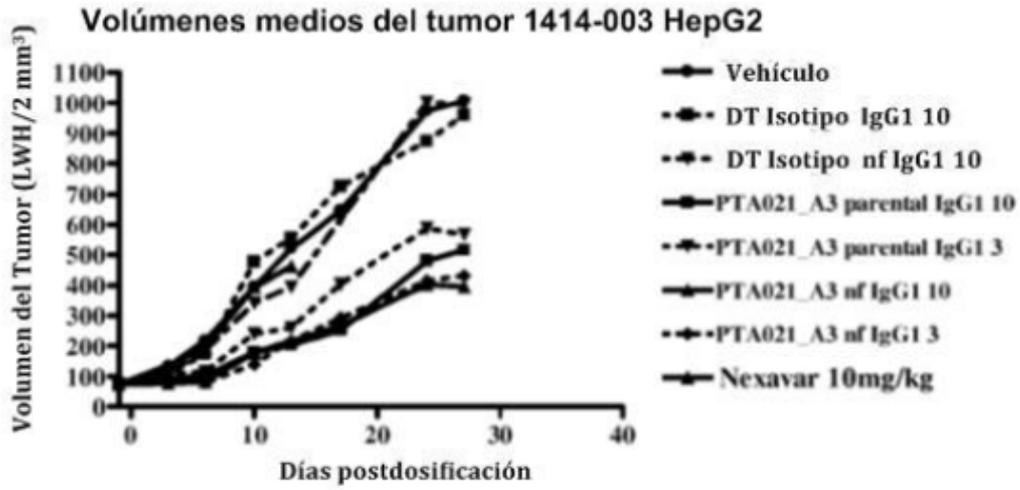


FIGURA 18

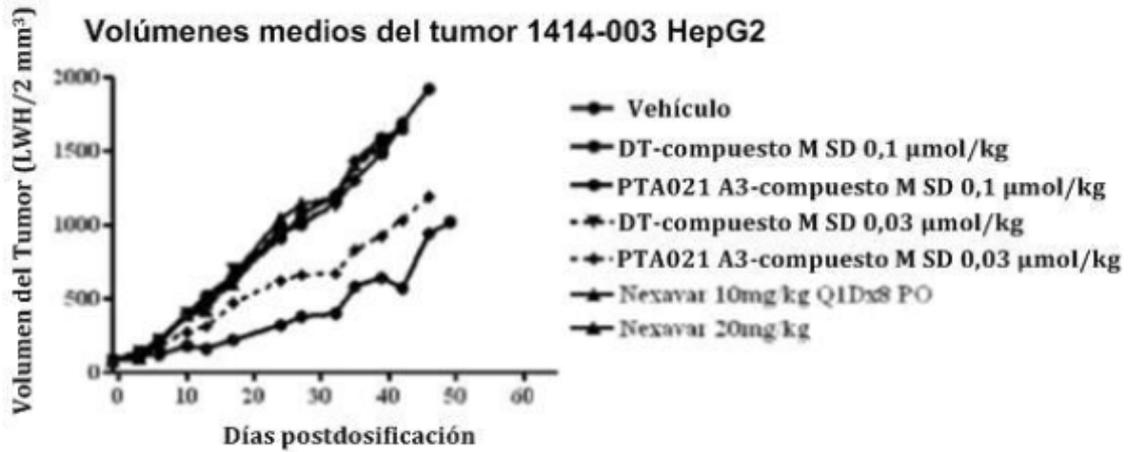


FIGURA 19

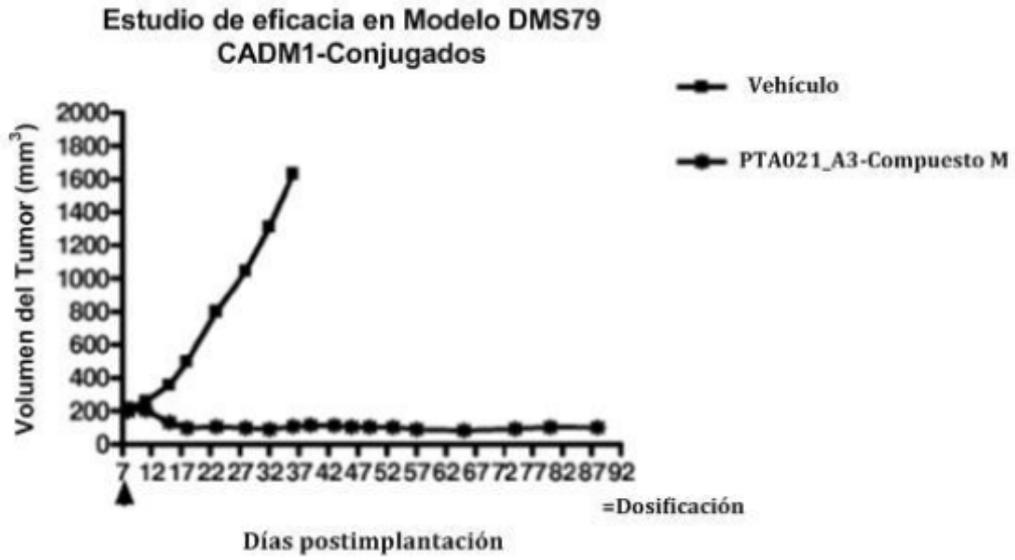


FIGURA 20A

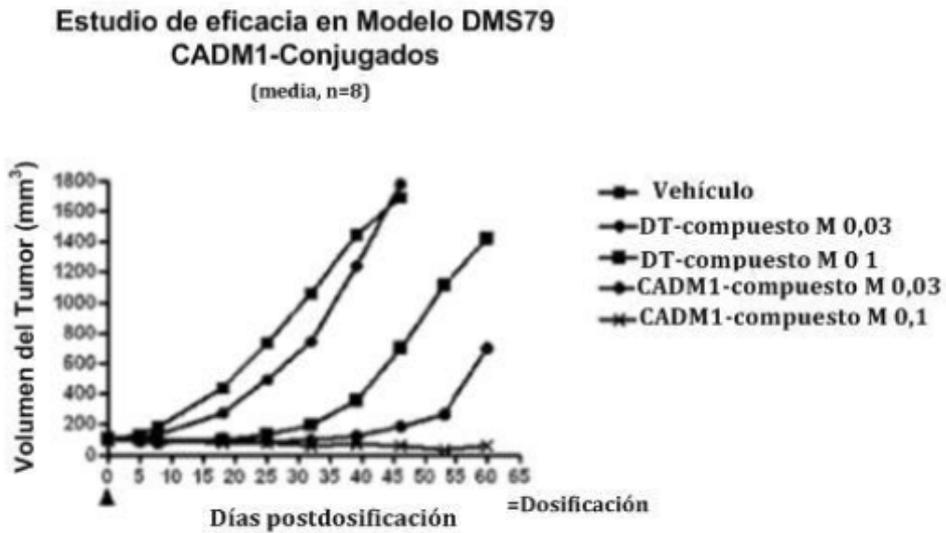


FIGURA 20B

Análisis 082108\_ADCC del anticuerpo CADM1 PTA021\_A3 y anticuerpo PT A021\_A3 nf en células HepG2.

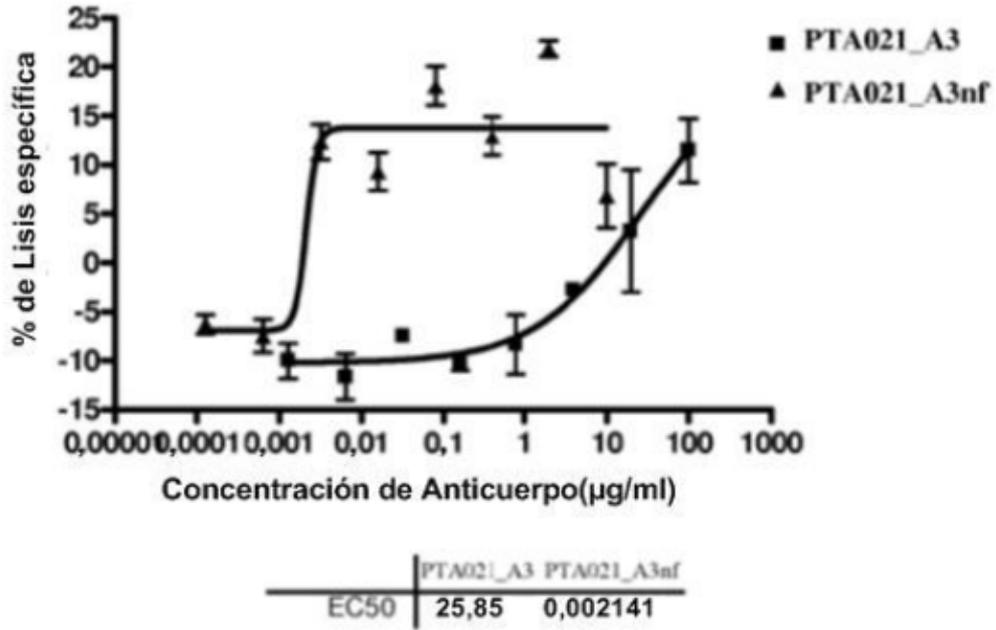


FIGURA 21

Análisis 082108\_ADCC del anticuerpo CADM1 PTA021\_A3 y anticuerpo A021\_A3 nf en células 786-O.

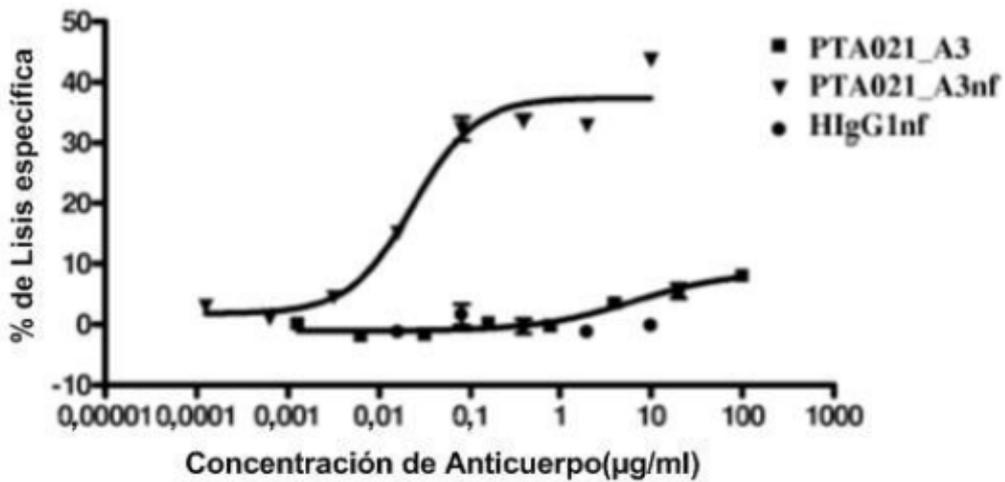
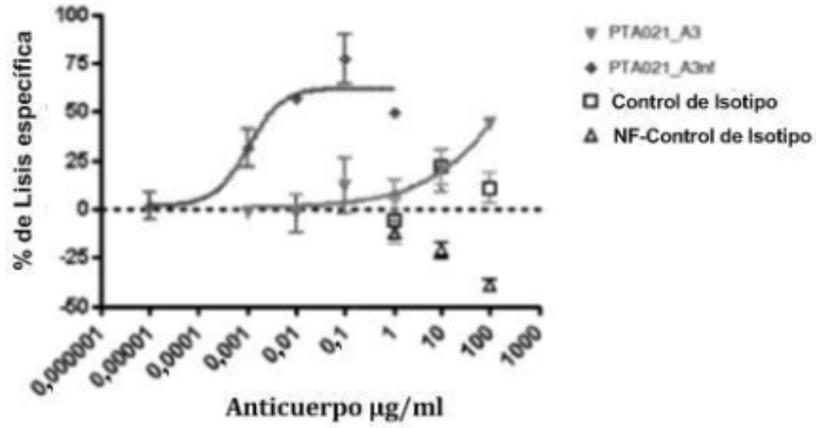


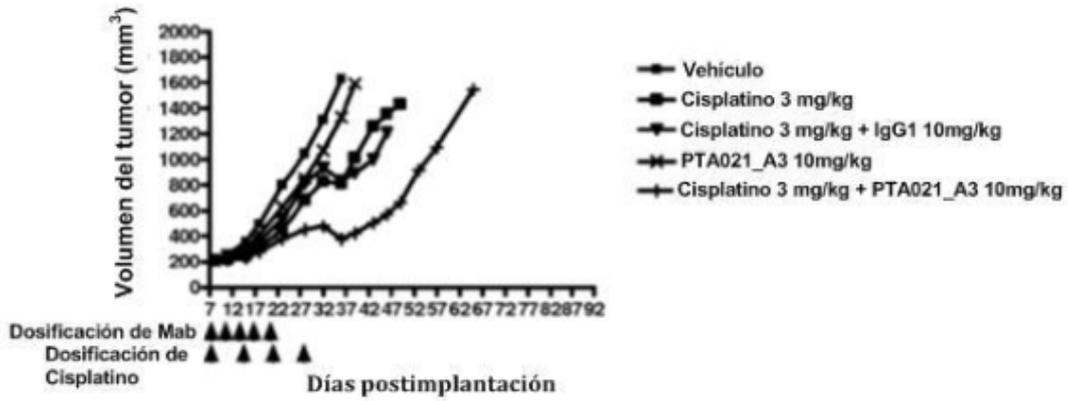
FIGURA 22

**Análisis ADCC del anticuerpo CADM1 PTA021\_A3 y anticuerpo PT A021\_A3 nf en células DMS79, SCLC.**



**FIGURA 23**

**Eficacia de CADM1, Cisplatino o Cisplatino + CADM1, Células DMS79 en los SCID (media, n=8)**



**FIGURA 24**

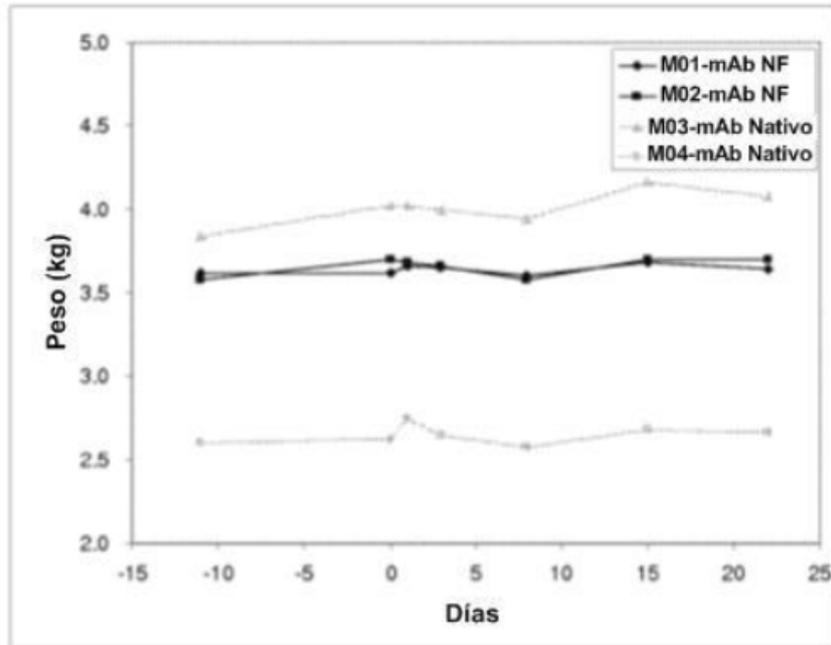


FIGURA 25A

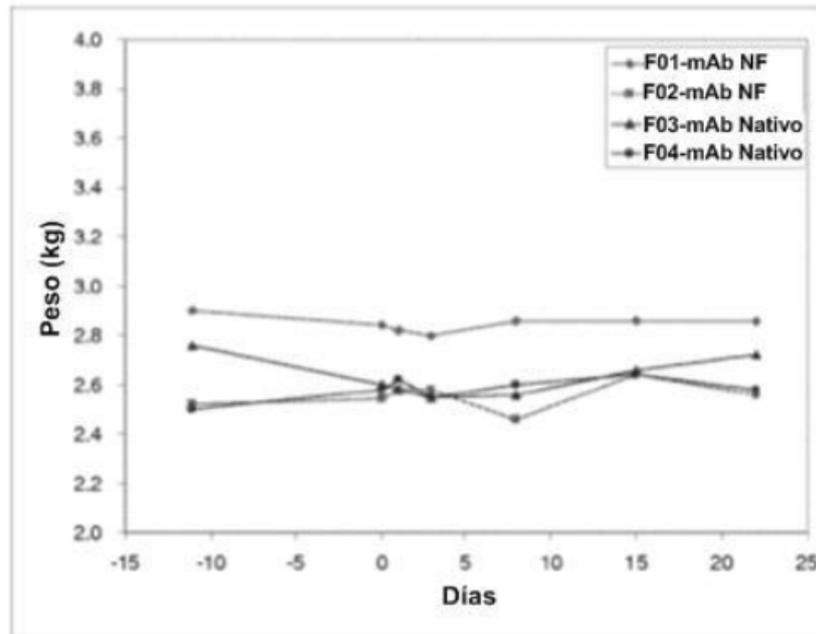


FIGURA 25B

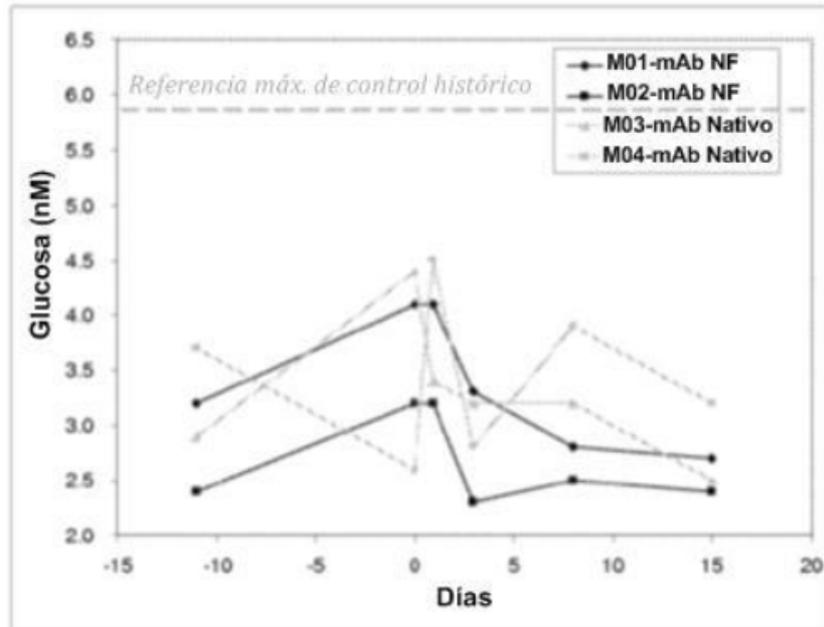


FIGURA 26A

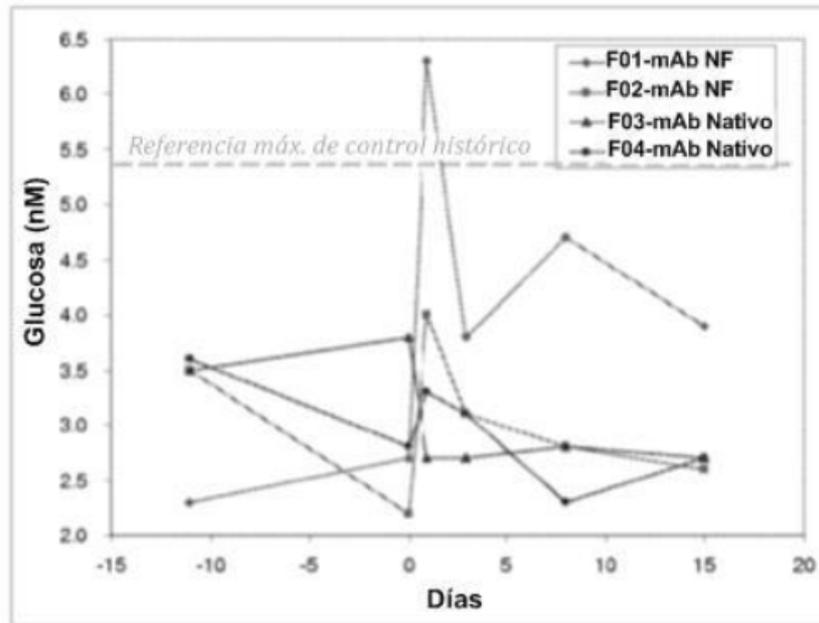


FIGURA 26B

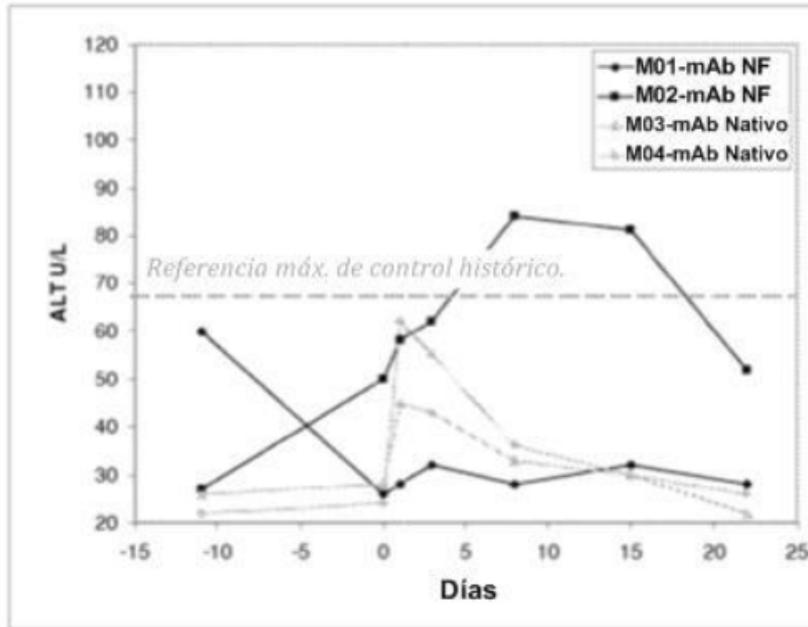


FIGURA 27A

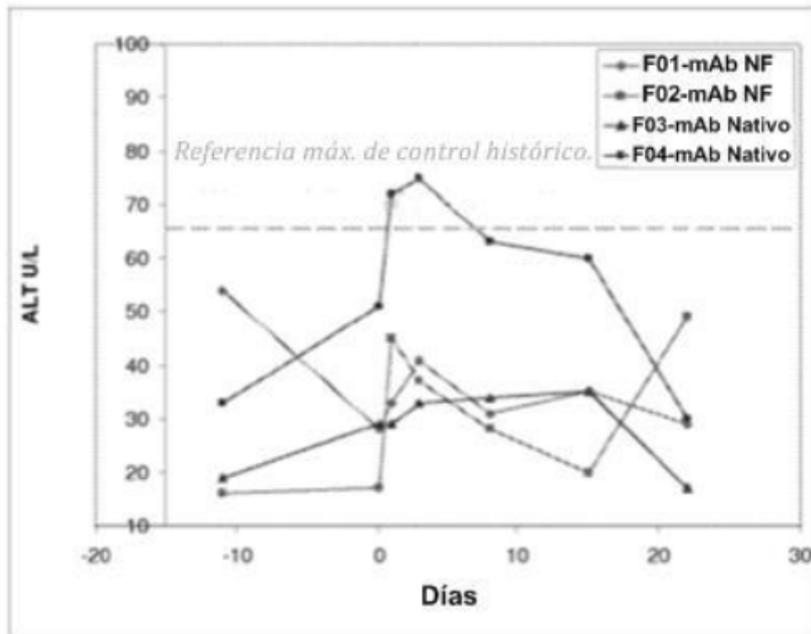


FIGURA 27B

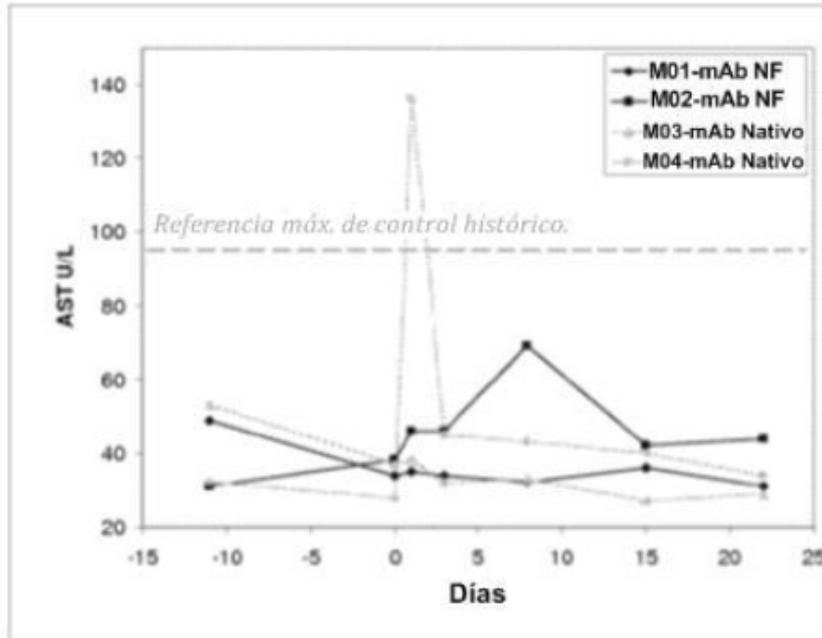


FIGURA 28A

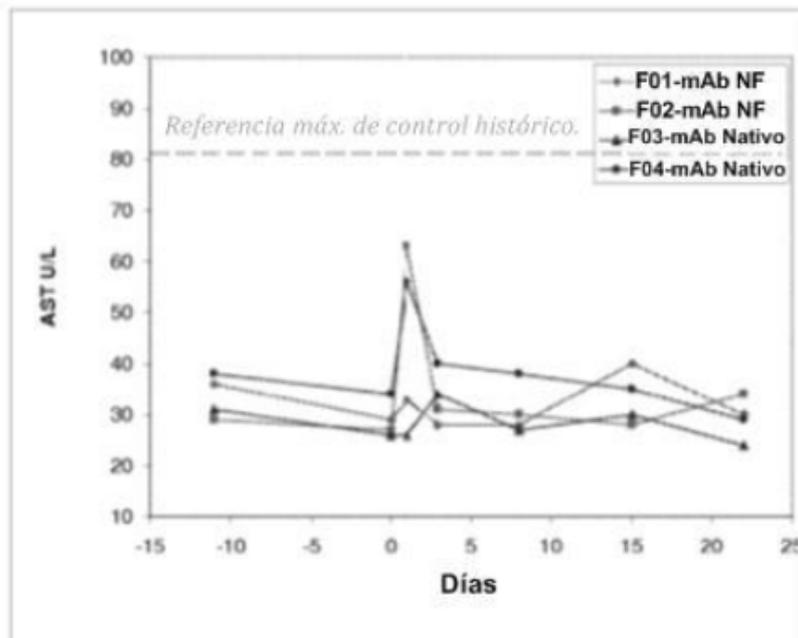


FIGURA 28B

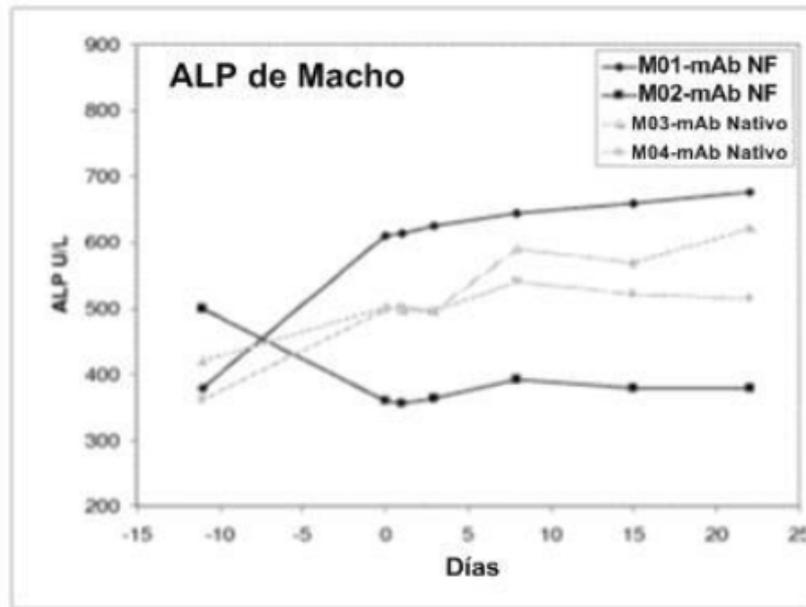


FIGURA 29A

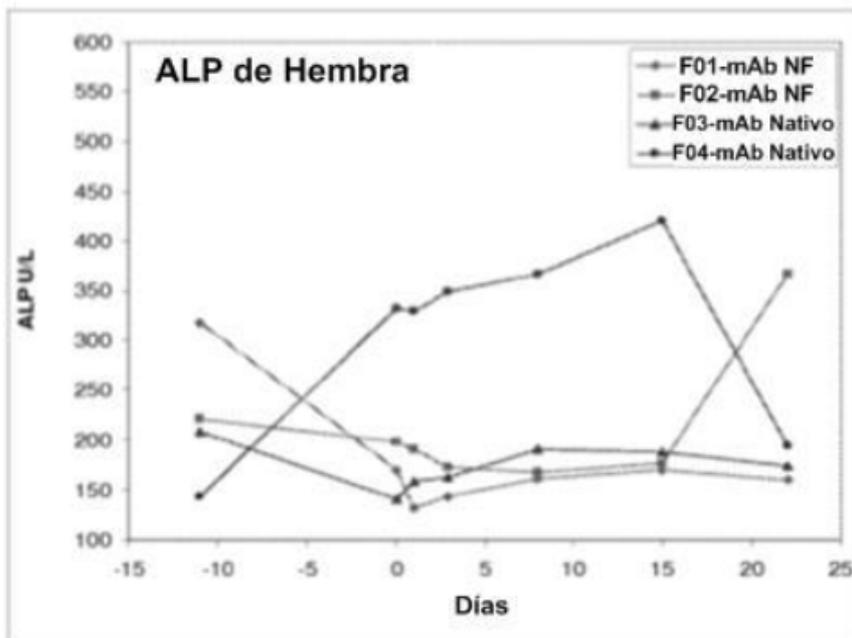


FIGURA 29B

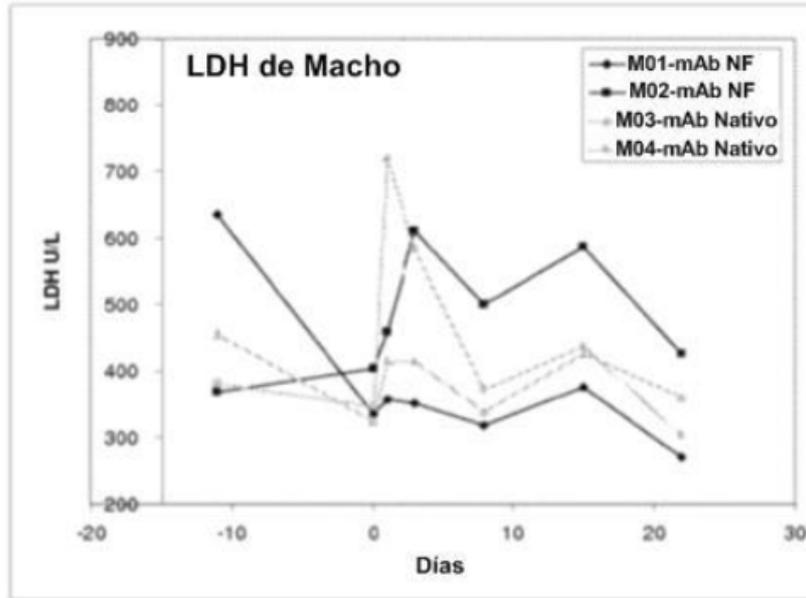


FIGURA 30A

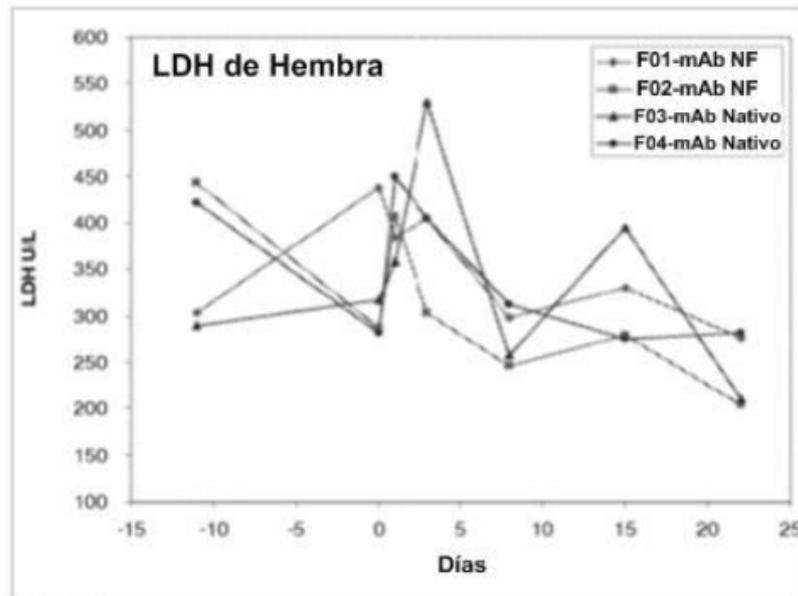


FIGURA 30B

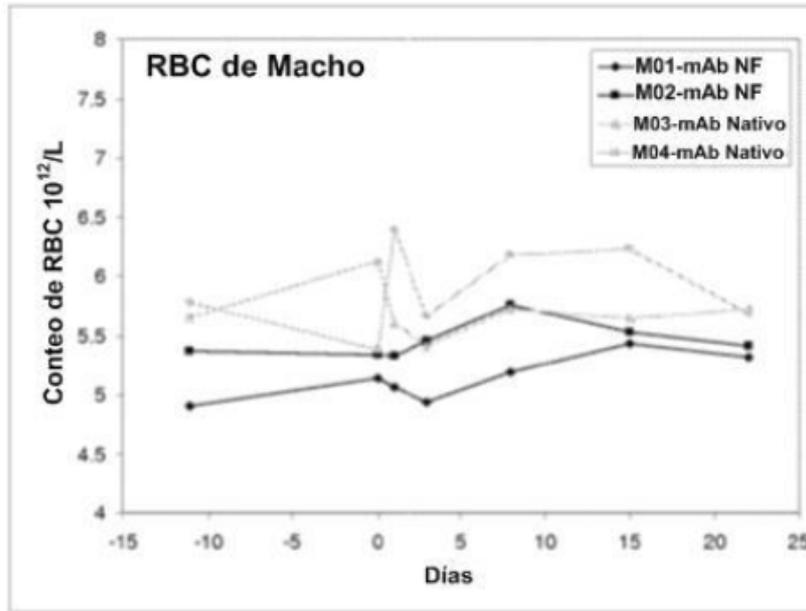


FIGURA 31A

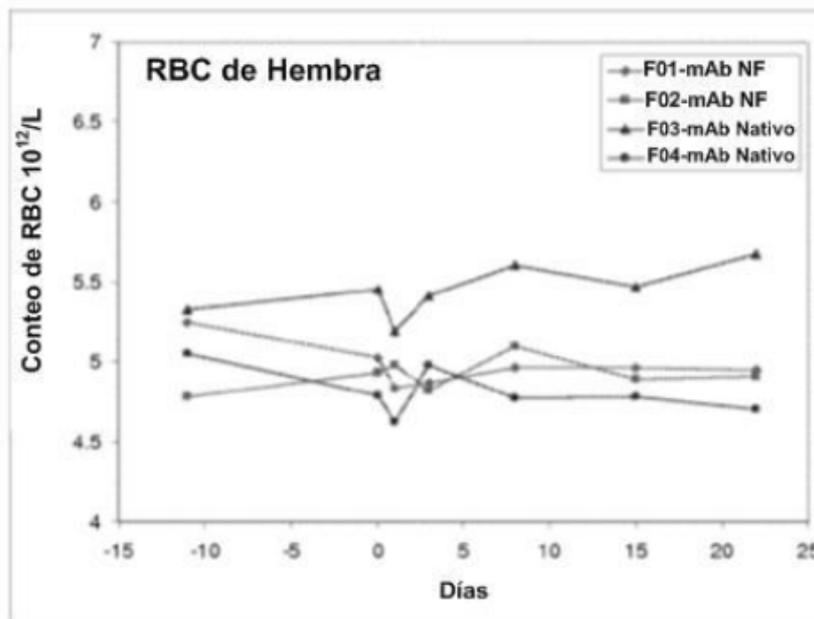


FIGURA 31B

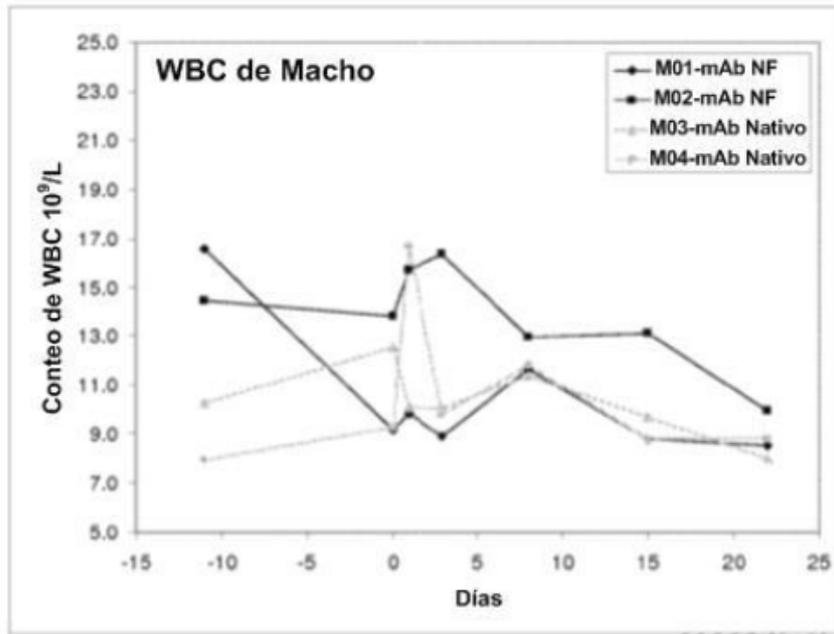


FIGURA 32A

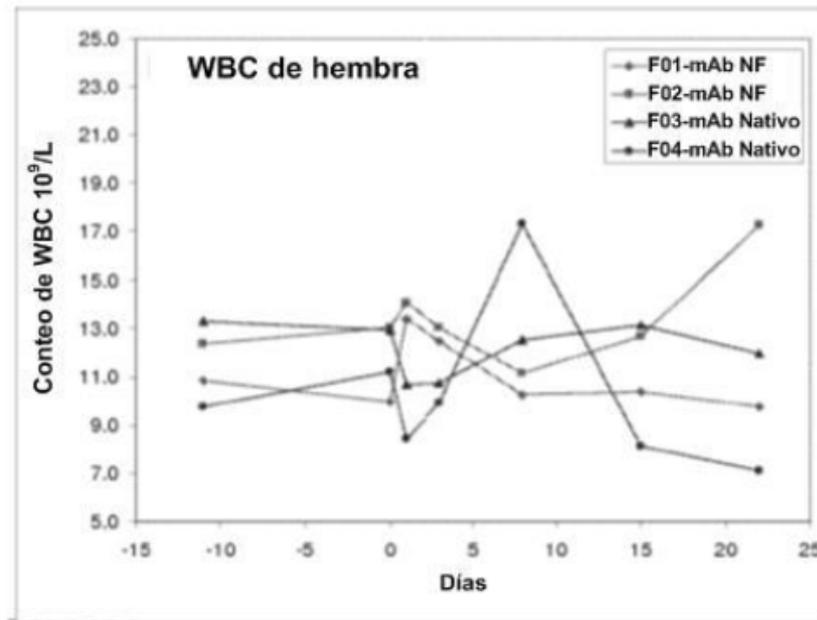


FIGURA 32B