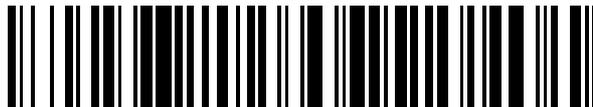


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 960**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2012 PCT/US2012/044703**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13003625**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2012 E 12735991 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2726508**

54 Título: **Anticuerpos para ADP-ribosil ciclasa 2**

30 Prioridad:

**28.06.2011 US 201161502167 P**  
**27.06.2012 WO PCT/US2012/044451**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.11.2017**

73 Titular/es:

**OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD. (100.0%)**  
**94A Innovation Drive, Milton Park**  
**94A Milton Park Abingdon, Oxon OX14 4RY, GB**

72 Inventor/es:

**ROHLFF, CHRISTIAN y**  
**TERRETT, JONATHAN, ALEXANDER**

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 2 640 960 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 para ADP-ribosil ciclasa 2

## Introducción

5 La presente divulgación se refiere en general a los campos de inmunología y biología molecular. Más específicamente, se proporcionan aquí anticuerpos y otras proteínas terapéuticas dirigidas contra la ADP-ribosil ciclasa 2, ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos y proteínas terapéuticas, métodos para preparar anticuerpos monoclonales y otras proteínas terapéuticas y métodos para el tratamiento de enfermedades tales como cánceres mediados por la expresión/actividad de la ADP-ribosil ciclasa 2 y/o asociados por lo tanto con expresión/actividad anormal de ligandos.

## 10 Antecedentes de la invención

15 La ADP-ribosil ciclasa 2 (también conocida como antígeno estromal de médula ósea 1 (BST1) o CD157) es una ectoenzima bifuncional anclada en lípidos que cataliza la ciclación e hidrólisis de ribonucleótidos. Genera los segundos mensajeros nucleótidos de ADP-ribosa cíclica y ADP-ribosa que son capaces de activar la liberación de calcio y la fosforilación de proteínas (FEBS Lett., 1994, 356 (2-3): 244-8). Es capaz de soportar el crecimiento de células pre-B de una forma paracrina, posiblemente a través de la generación de metabolitos NAD<sup>+</sup> (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91: 5325-5329; J Biol Chem. 2005, 280: 5343-5349).

20 La ADP-ribosil ciclasa 2 y su homólogo, CD38, parecen actuar como receptores, generando segundos metabolitos mensajeros que inducen la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular a través del receptor de rianodina (Biochem Biophys Res Commun., 1996, 228 (3): 838-45). También puede actuar a través de la integrina CD11b para efectuar la liberación de Ca<sup>2+</sup> a través de la ruta de la PI-3 quinasa (J Biol Regul Homeost Agents, 2007; 21 (1-2): 5-11). No se ha informado previamente que BST1 se origine de leucemia mieloide aguda (LMA), cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de pulmón o membranas de células de cáncer pancreático y representa una proteína de nuevo valor terapéutico y diagnóstico. También se muestra que BST1 se expresa en monocitos y granulocitos, los cuales pueden estar asociados y activados en enfermedades tales como asma, gota, enfermedad de Crohn, lupus y diabetes. Los monocitos también están implicados en el desarrollo de placas ateroscleróticas.

## Sumario de la invención

30 La presente divulgación proporciona anticuerpos dirigidos contra BST1, ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos y proteínas terapéuticas, métodos para preparar anticuerpos anti-BST1, y uso de los anticuerpos para el tratamiento de enfermedades, tales como los trastornos mediados por BST1, por ejemplo, cánceres humanos incluyendo la leucemia mieloide aguda (LMA), la leucemia linfocítica crónica de células B, el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, el cáncer de riñón, el cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de pulmón, el cáncer de ovario, el cáncer pancreático denominados en lo sucesivo 'las enfermedades de la invención'; también se describen métodos de tratamiento de enfermedades inflamatorias humanas, incluyendo asma, gota, enfermedad de Crohn, lupus, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis, diabetes y aterosclerosis.

35 Por tanto, la presente divulgación proporciona anticuerpos aislados, en particular anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos, humanizados y totalmente humanos que se unen al BST1 y exhiben una o más propiedades funcionales deseables. Tales propiedades incluyen, por ejemplo, unión específica de alta afinidad al BST1. También se proporciona el uso de los anticuerpos de la invención para tratar una variedad de las enfermedades mediadas por BST1.

40 En una realización, el anticuerpo anti-BST1 aislado posee:

a) una región variable de cadena pesada que comprende:

i) una primera CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 10;

ii) una segunda CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 51;

iii) una tercera CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 14; y

45 b) una región variable de cadena ligera que comprende:

i) una primera CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 16;

ii) una segunda CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 18;

iii) una tercera CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 20.

En un ejemplo adicional, el anticuerpo anti-BST1 aislado posee:

50 a) una región variable de cadena pesada que comprende:

- i) una primera CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 9;
  - ii) una segunda CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 11;
  - iii) una tercera CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 13; y
- b) una región variable de cadena ligera que comprende:

- 5
- i) una primera CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 15;
  - ii) una segunda CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 17;
  - iii) una tercera CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 19.

En un ejemplo adicional, el anticuerpo anti-BST1 aislado posee:

a) una región variable de cadena pesada que comprende:

- 10
- i) una primera CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 56;
  - ii) una segunda CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 57;
  - iii) una tercera CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 58; y
- b) una región variable de cadena ligera que comprende:

- i) una primera CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 59;
- 15
- ii) una segunda CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 60;
  - iii) una tercera CDR que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a la SEQ ID NO: 61.

El epítipo o epítipos reconocidos por los anticuerpos de la invención se encuentran dentro de la secuencia polipeptídica de la SEQ ID NO: 44.

- 20
- En un ejemplo adicional, los anticuerpos comprenden CDR variables en comparación con los anticuerpos progenitores descritos en el presente documento. Por lo tanto, la divulgación proporciona variantes de anticuerpos que comprenden variantes de regiones variables de un anticuerpo progenitor, en donde el anticuerpo progenitor comprende una primera vhCDR que comprende la SEQ ID NO: 10, una segunda vhCDR que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 51, una tercera vhCDR que comprende la SEQ ID NO: 14, una primera vlCDR que comprende la SEQ ID NO: 16, una segunda vlCDR que
- 25
- comprende la SEQ ID NO: 18; y una tercera vlCDR que comprende la SEQ ID NO: 20, y en la que la variante de anticuerpo tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos colectivamente en el conjunto de la primera vhCDR, la segunda vhCDR, la tercera vhCDR, la primera vlCDR, la segunda vlCDR y la tercera vlCDR, con 1 a 4 sustituciones de uso particular, y en donde el anticuerpo retiene la unión específica a BST1. De forma similar, el anticuerpo progenitor puede comprender una primera vhCDR que comprende la SEQ ID NO: 9, una segunda vhCDR que
- 30
- comprende la SEQ ID NO: 11, una tercera vhCDR que comprende la SEQ ID NO: 13; una primera vlCDR que comprende la SEQ ID NO: 15, una segunda vlCDR que comprende la SEQ ID NO: 17 y una tercera vlCDR que comprende una SEQ ID NO: 19. Además, el anticuerpo progenitor puede comprender una primera vhCDR que comprende la SEQ ID NO: 56, una segunda vhCDR que comprende la SEQ ID NO: 57, una tercera vhCDR que
- 35
- comprende la SEQ ID NO: 58, una primera vlCDR que comprende la SEQ ID NO: 59, una segunda vlCDR que comprende la SEQ ID NO: 60 y una tercera vlCDR que comprende una SEQ ID NO: 61.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-BST1 aislado posee la secuencia de la región variable de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 2 y la secuencia de la región variable de cadena ligera tal como la representada por la SEQ ID NO: 4.

- 40
- En otro ejemplo, el anticuerpo anti-BST1 aislado posee la secuencia de la región variable de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 45 y la secuencia de la región variable de cadena ligera tal como la representada por la SEQ ID NO: 49.

En otro ejemplo, el anticuerpo anti-BST1 aislado posee la secuencia de la región variable de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de la región variable de cadena ligera como la representada por la SEQ ID NO: 3.

- 45
- En un ejemplo adicional, el anticuerpo anti-BST1 aislado posee la secuencia de la región variable de cadena pesada representada por la SEQ ID NO: 52 y la secuencia de la región variable de cadena ligera tal como la representada por la SEQ ID NO: 53.

En una realización, cualquiera de los anticuerpos precedentes posee un dominio Fc. En algunas realizaciones, el

dominio Fc es humano. En otras realizaciones, el dominio Fc es una variante del dominio Fc humano.

En otra realización, cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente son anticuerpos monoclonales.

5 En una realización, cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente posee además un agente conjugado. En algunas realizaciones, el agente conjugado es un agente citotóxico. En otras realizaciones, el agente conjugado es un polímero. En otra realización, el polímero es un polietilenglicol (PEG). En otra realización, el PEG es un derivado de PEG.

En un ejemplo, el anticuerpo aislado es un anticuerpo que compete con cualquiera de los anticuerpos precedentes por la unión a BST1.

10 En otra realización, se describe un método para preparar cualquiera de los anticuerpos precedentes, obteniéndose con el método una célula huésped que contiene una o más moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos anteriores, el crecimiento de la célula huésped en un cultivo de células huésped, proporcionando condiciones de cultivo de células huésped en las que se expresan una o más moléculas de ácido nucleico y se recupera el anticuerpo de la célula huésped o del cultivo de células huésped.

En un ejemplo, cualquiera de los anticuerpos anti-BST1 descritos se proporciona en una composición farmacéutica.

15 En otro ejemplo, un método para tratar o prevenir una enfermedad asociada con BST1, siendo el método administrar a un sujeto que lo necesite cualquiera de los anticuerpos anteriores en una cantidad eficaz.

20 La presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción del mismo de unión al antígeno, un fragmento de anticuerpo o un mimético de anticuerpo que se une a un epítipo en el BST1 humano reconocido por un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: seleccionada del grupo que consiste en 2, 1 y 52 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una SEQ ID NO: seleccionada del grupo que consiste en 4, 3 y 53. En algunos ejemplos, el anticuerpo aislado es un anticuerpo de longitud completa de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo completo, una porción de unión al antígeno, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena única, un inmunoconjugado, un anticuerpo defucosilado y un anticuerpo biespecífico. También se describen fragmentos de anticuerpos, estos pueden seleccionarse del grupo que consiste en: un Unicuerpo, un anticuerpo de dominio y un Nanocuerpo. En algunas realizaciones, 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.

30 En algunos ejemplos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un Afficuerpo, un DARPin, una Anticalina, un Avímero, un Versacuerpo y una Duocalina.

En realizaciones alternativas, las composiciones de la presente invención comprenden un anticuerpo aislado o una porción de unión al antígeno y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

35 El anticuerpo descrito en la presente memoria puede ser una composición que comprende el anticuerpo aislado porción de unión al antígeno y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la invención comprende una molécula aislada de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y ligera del anticuerpo aislado porción de unión al antígeno. Otros aspectos de la invención comprenden vectores de expresión que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico, y células huésped que comprenden tales vectores de expresión.

40 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-BST1, comprendiendo dicho método las etapas de: obtener una célula huésped que contiene una o más moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo de la invención; cultivar la célula huésped en un cultivo de células huésped; proporcionar condiciones de cultivo de células huésped en las que se expresan una o más moléculas de ácido nucleico; y recuperar el anticuerpo de la célula huésped o del cultivo de células huésped.

45 Se describen aquí métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada con células objetivo que expresan el BST1, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a un sujeto un anticuerpo anti-BST1, o porción del mismo de unión al antígeno, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad. En algunos ejemplos, la enfermedad tratada o prevenida por los anticuerpos o porción de los mismos de unión al antígeno, es cáncer humano.

50 También se describen métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada con células objetivo que expresan el BST1, comprendiendo dicho método la etapa de administrar a un sujeto un anticuerpo anti-BST1, o porción del mismo de unión al antígeno, en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad. En algunos ejemplos, la enfermedad tratada o prevenida por los anticuerpos o porción de unión al antígeno es cáncer humano.

5 En otras realizaciones, la invención está dirigida a un anticuerpo anti-BST1, o porción del mismo de unión al antígeno, para uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con células objetivo que expresan el BST1. En algunos aspectos, la enfermedad tratada o prevenida por los anticuerpos o porción de los mismos de unión al antígeno de la invención es cáncer humano. En algunas realizaciones, las enfermedades tratadas o prevenidas por los anticuerpos de la presente invención son las enfermedades de la invención.

10 También se describe el uso de un anticuerpo anti-BST1, o porción del mismo de unión al antígeno, para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con células objetivo que expresan el BST1. En algunos ejemplos, la enfermedad tratada o prevenida por el medicamento de la invención es cáncer humano. En algunos ejemplos, las enfermedades tratadas o prevenidas por el medicamento de la presente invención son las enfermedades de la invención.

15 También se describe un anticuerpo monoclonal aislado o una o porción del mismo de unión al antígeno, un fragmento de anticuerpo o un mimético de anticuerpo que se une a un epítipo en el BST1 humano reconocido por un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 2 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 4; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 3; la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada expuesta en la SEQ ID NO: 52 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera expuesta en la SEQ ID NO: 53. En algunos ejemplos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena única, un inmunoconjugado, un anticuerpo defucosilado y un anticuerpo biespecífico. En otros ejemplos, el fragmento de anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en: un Unicuerpo, un anticuerpo de dominio y un Nanocuerpo. En algunos ejemplos, el anticuerpo mimético se selecciona del grupo que consiste en: un Afficuerpo, un DARPin, una Anticalina, un Avímero, un Versacuerpo y una Duocalina. En otras realizaciones, la composición comprende el anticuerpo aislado o porción del mismo de unión al antígeno y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

Otra realización de la presente invención es un hibridoma que expresa el anticuerpo o parte del mismo de unión al antígeno de uno cualquiera de los anticuerpos de la invención.

También se describen métodos para preparar los anticuerpos de la divulgación, que comprende las etapas de:

inmunizar un animal con un péptido de BST1;

35 recuperar ARNm de las células B de dicho animal;

convertir dicho ARNm en ADNc;

expresar dicho ADNc en fagos de manera que los anticuerpos anti-BST1 codificados por dicho ADNc se presenten en la superficie de dichos fagos;

seleccionar fagos que presentan anticuerpos anti-BST1;

40 recuperar moléculas de ácido nucleico de dichos fagos seleccionados que codifican dichas inmunoglobulinas anti-BST1;

expresar dichas moléculas de ácido nucleico recuperadas en una célula huésped; y

recuperar anticuerpos de dicha célula huésped que se unen al BST1.

45 En algunos ejemplos, el anticuerpo monoclonal aislado, o una o porción del mismo de unión al antígeno, se une a un epítipo sobre el polipéptido de BST1 que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 44 reconocida por un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido expuesta en la SEQ ID NO: seleccionada del grupo que consiste en 2, 1 o 52, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una SEQ ID NO: seleccionada del grupo que consiste en 4, 3 o 53.

50 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente divulgación detallada y ejemplos que no deben ser interpretados como limitativos.

Breve divulgación de las figuras

La Figura 1a muestra la alineación de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR1 de cadena pesada A1 (SEQ ID NO: 21) con los nucleótidos 138392-138424 de la secuencia de nucleótidos 1-80 de V<sub>H</sub> de la línea germinal de ratón (SEQ ID NO: 33); la alineación de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR1 de cadena pesada de A2 (SEQ ID NO: 22) con los nucleótidos 153362-153394 de la secuencia de nucleótidos 1-39 de V<sub>H</sub> de la línea germinal de ratón (SEQ ID NO: 35).

La Figura 1b muestra la alineación de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR2 de cadena pesada de A1 (SEQ ID NO: 23) con los nucleótidos 138461-138511 de la secuencia de nucleótidos 1-80 de V<sub>H</sub> de la línea germinal de ratón (SEQ ID NO: 34); la alineación de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR2 de cadena pesada de A2 (SEQ ID NO: 24) con los nucleótidos 153431-153481 de la secuencia de nucleótidos 1-39 de V<sub>H</sub> de la línea germinal de ratón (SEQ ID NO: 36).

La Figura 2a muestra la alineación de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR1 de cadena ligera de A1 (SEQ ID NO: 27) con los nucleótidos 496-531 de la secuencia de nucleótidos 4-74 de V<sub>K</sub> de la línea germinal de ratón (SEQ ID NO: 37); la alineación de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR1 de cadena ligera de A2 (SEQ ID NO: 28) con los nucleótidos 523-552 de la secuencia de nucleótidos 4-55 de V<sub>K</sub> de la línea germinal de ratón (SEQ ID NO: 40).

La Figura 2b muestra la alineación de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR2 de cadena ligera de A1 (SEQ ID NO: 29) con los nucleótidos 577-597 de la secuencia de nucleótidos 4-74 de V<sub>K</sub> de la línea germinal de ratón (SEQ ID NO: 38); la alineación de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR2 de cadena ligera de A2 (SEQ ID NO: 30) con los nucleótidos 598-618 de la secuencia de nucleótidos 4-55 de V<sub>K</sub> de la línea germinal de ratón (SEQ ID NO: 41).

La Figura 2c muestra la alineación de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR3 de cadena ligera de A1 (SEQ ID NO: 31) con los nucleótidos 691-718 de la secuencia de nucleótidos 4-74 de V<sub>K</sub> de la línea germinal de ratón (SEQ ID NO: 39); la alineación de las secuencias de nucleótidos de las regiones CDR3 de cadena ligera de A2 (SEQ ID NO: 32) con los nucleótidos 715-739 de la secuencia de nucleótidos 4-55 de V<sub>K</sub> de la línea germinal del ratón (SEQ ID NO: 42).

Las Figuras 3a y 3b muestran los resultados del análisis de citometría de flujo de BST1 en células A549 y H226.

Las Figuras 4a y 4b muestran la internalización de anticuerpos monoclonales anti-BST1 por células A549 y H226, usando el ensayo de MabZAP.

La Figura 5 muestra la alineación de los residuos 21-137 de la SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 45), la cadena V<sub>H</sub> humanizada con las regiones CDR (resaltadas en negrita) de la SEQ ID NO: 2 transferidas a las posiciones correspondientes de V<sub>H</sub> BF238102 de línea germinal humana (SEQ ID NO: 46), con V<sub>H</sub> BF238102 de línea germinal humana (SEQ ID NO: 47). Residuos que muestran un contacto significativo con regiones CDR sustituidas por los residuos humanos correspondientes. Estas sustituciones (subrayadas) se realizaron en las posiciones 30, 48, 67, 71 y 100.

La Figura 6 muestra la alineación de los residuos 22-128 de la SEQ ID NO: 4 (SEQ ID NO: 48), la cadena V<sub>L</sub> humanizada con las regiones CDR (resaltadas en negrita) de la SEQ ID NO: 4 transferidas a las posiciones correspondientes de V<sub>L</sub> X72441 de línea germinal humana (SEQ ID NO: 49) con la V<sub>L</sub> X72441 de línea germinal humana (SEQ ID NO: 50). Residuos que muestran un contacto significativo con regiones CDR sustituidas por los residuos humanos correspondientes. Se realizó una sustitución (subrayada) en la posición 71.

La Figura 7 muestra la alineación de la región CDR2 de cadena pesada A2 (SEQ ID NO: 12) con posibles sustituciones de aminoácidos (SEQ ID NO: 51) sin perder la afinidad de unión al antígeno.

La Figura 8 muestra BST1\_A2 y BST1\_A2\_NF que provocan una respuesta de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en presencia de células efectoras.

#### Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a anticuerpos aislados, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos monoclonales, por ejemplo, que se unen específicamente al BST1 con alta afinidad como se describe aquí. En ciertos ejemplos, los anticuerpos proporcionaron características estructurales particulares tales como regiones CDR con secuencias de aminoácidos particulares. Esta divulgación proporciona anticuerpos aislados (que, como se describe a continuación, incluyen una amplia variedad de estructuras, derivados, miméticos y conjugados bien conocidos), métodos para fabricar dichas moléculas y composiciones farmacéuticas que comprenden dichas moléculas y un vehículo farmacéutico. Esta divulgación también se refiere a métodos de uso de las moléculas, tales como para detectar el BST1, así como para tratar enfermedades compañeras con la expresión del BST1, tal como el BST1 expresado en tumores y enfermedades inflamatorias, incluyendo las enfermedades de la invención.

Con el fin de que la presente divulgación se pueda entender más fácilmente, se definen en primer lugar ciertos términos. Las definiciones adicionales se exponen a lo largo de la divulgación detallada.

Los anticuerpos humanizados y murinos de esta divulgación pueden, en ciertos casos, reaccionar de forma cruzada con el BST1 de especies distintas de la humana. En ciertos ejemplos, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para uno o más BST1 humanos y no pueden exhibir especies u otros tipos de reactividad cruzada no humana.

- 5 El término "respuesta inmune" se refiere a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas y complemento) que resultan en daño selectivo, destrucción, 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.
- 10 Una "vía de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre diversas 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. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "receptor de la 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" es el BST1.
- 15 El término "anticuerpo" al que se hace referencia en el presente documento incluye, como mínimo, un fragmento de unión al antígeno (es decir, "porción de unión al antígeno") de una inmunoglobulina.

La definición de "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a veces denominados en la presente memoria como "miméticos de anticuerpos"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (a veces denominados como "conjugados de anticuerpos") y fragmentos y/o derivados de cada uno, respectivamente. En general, un anticuerpo de longitud completa (a veces denominado en la presente memoria como "anticuerpos completos") se refiere a una glicoproteína que puede comprender al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como  $V_H$ ) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada aquí como  $V_L$  o  $V_K$ ) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L/V_K$  pueden subdividirse en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L/V_K$  está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo terminal amino hasta el extremo terminal carboxi en el orden siguiente: 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 tejidos o factores huésped, incluyendo diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico de complemento.

20

25

30

35

En un ejemplo, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo específicos incluyen, pero no se limitan a, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$ , (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ , (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo anticuerpo, (iv) el fragmento dAb, que consiste en un solo dominio variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio  $V_H$  y un dominio  $V_L$  están unidos por un enlazador peptídico que permite asociar los dos dominios para formar un sitio de unión al antígeno, (viii) dímeros de Fv de cadena única biespecíficos y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser modificados. Por ejemplo, las moléculas pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro que enlazan los dominios  $V_H$  y  $V_L$ . Ejemplos de formatos y arquitecturas de anticuerpos se describen en Holliger & Hudson (2006) Nature Biotechnology 23 (9): 1126-1136, y Carter (2006) Nature Reviews Immunology 6: 343-357, y las referencias citadas allí.

40

45

La presente divulgación proporciona análogos de anticuerpos. Tales análogos pueden comprender una variedad de estructuras, incluyendo, pero sin limitarse a, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (a veces denominados aquí como "miméticos de anticuerpos"), fusiones de anticuerpo, conjugados de anticuerpo, y fragmentos de cada uno, respectivamente.

50

En un ejemplo, la inmunoglobulina comprende un fragmento de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo específicos incluyen, pero sin limitación, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$ , (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ , (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb, que consiste en una única variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio  $V_H$  y un dominio  $V_L$  están unidos por un enlazador peptídico que permite asociar los dos dominios para formar un sitio de unión al antígeno, (viii) dímeros Fv de cadena única biespecíficos, y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión

55

60

génica. Los fragmentos de anticuerpo pueden ser modificados. Por ejemplo, las moléculas pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro que enlazan los dominios  $V_H$  y  $V_L$ . Ejemplos de formatos de anticuerpos y arquitecturas se describen en Holliger & Hudson, 2006, Nature Biotechnology 23 (9): 1126-1136, y Carter 2006, Nature Reviews Immunology 6: 343-357 y las referencias citadas allí.

5 Los genes de inmunoglobulina reconocidos, por ejemplo, en seres humanos, incluyen los loci genéticos kappa ( $\kappa$ ), lambda ( $\lambda$ ) y cadena pesada, que juntos comprenden la miríada de genes de región variable y los genes de región constante mu ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ), gamma ( $\gamma$ ), sigma ( $\sigma$ ) y alfa ( $\alpha$ ) que codifican los isotipos IgM, IgD, IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgE e IgA (IgA1 e IgA2) respectivamente. Se entiende que el anticuerpo en la presente invención incluye anticuerpos de longitud completa y fragmentos de anticuerpos y puede referirse a un anticuerpo natural de cualquier organismo, un anticuerpo modificado por ingeniería genética o un anticuerpo generado de forma recombinante para fines experimentales, terapéuticos u otros.

10 En una realización, un anticuerpo divulgado en la presente memoria puede ser un anticuerpo multiespecífico, y notablemente un anticuerpo biespecífico, también denominado a veces "diacuerpos". Estos son anticuerpos que se unen a dos (o más) antígenos diferentes. Los diacuerpos pueden fabricarse en una variedad de formas conocidas en la técnica, por ejemplo, preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos. En un ejemplo, el anticuerpo es un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas de tipo anticuerpo minimizadas que comprenden un scFv unido a un dominio  $C_H3$ . En algunos casos, el scFv puede unirse a la región Fc, y puede incluir algunas o todas las regiones de bisagra. Para una descripción de anticuerpos multiespecíficos, véase Holliger y Hudson (2006) Nature Biotechnology 23 (9): 1126-1136 y las referencias citadas allí.

15 Por "CDR" tal como se usa en la presente memoria se entiende una "región determinante de complementariedad" de un dominio variable de anticuerpo. La identificación sistemática de los residuos incluidos en los CDR ha sido desarrollada por Kabat (Kabat et al., (1991)) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Bethesda) y alternativamente por Chothia [Chothia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342: 877-883; Al-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273: 927-948]. Para los fines de la presente invención, las CDR se definen como un conjunto ligeramente más pequeño de residuos que las CDR definidas por Chothia. Las CDR  $V_L$  se definen aquí para incluir residuos en las posiciones 27-32 (CDR1), 50-56 (CDR2) y 91-97 (CDR3), en donde la numeración está de acuerdo con Chothia. Debido a que las CDR  $V_L$  como las define Chothia y Kabat son idénticas, la numeración de estas posiciones CDR  $V_L$  también es de acuerdo con Kabat. Las CDR  $V_H$  se definen aquí para incluir residuos en las posiciones 27-33 (CDR1), 52-56 (CDR2) y 95-102 (CDR3), en donde la numeración está de acuerdo con Chothia. Estas posiciones de CDR  $V_H$  corresponden a las posiciones de Kabat 27-35 (CDR1), 52-56 (CDR2) y 95-102 (CDR3).

20 Como se apreciará por los expertos en la técnica, las CDR divulgadas en la presente memoria también pueden incluir variantes, por ejemplo, cuando se retromutan las CDR divulgadas en la presente memoria descriptiva en diferentes regiones marco. Generalmente, la identidad de ácidos nucleicos entre variantes individuales de CDR son al menos el 80% con las secuencias representadas en este documento, y más típicamente con identidades preferiblemente crecientes de al menos 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% y casi 100%. De manera similar, el "porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácidos nucleicos" con respecto a la secuencia de ácido nucleico de las proteínas de unión identificadas en la presente memoria se define como el porcentaje de residuos de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de nucleótidos en la secuencia codificación de la proteína de unión al antígeno. Un método específico utiliza el módulo BLASTN de WU-BLAST-2 ajustado a los parámetros por defecto, con intervalo de superposición y fracción de superposición establecidos en 1 y 0,125, respectivamente y sin filtros seleccionados.

25 Generalmente, la identidad de secuencia de ácido nucleico entre las secuencias de nucleótidos que codifican variantes individuales de CDR y las secuencias de nucleótidos representadas en la presente memoria son al menos 80%, y más típicamente con identidades preferiblemente crecientes de al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% y casi 100%.

30 Por lo tanto, una "variante de CDR" es una con la homología, similitud o identidad especificada con la CDR original de la invención, y comparte la función biológica, incluyendo, pero sin limitarse a, al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la especificidad y/o actividad de la CDR original.

35 Aunque el sitio o región para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la mutación en sí no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, con el fin de optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, la mutagénesis aleatoria puede llevarse a cabo en el codón o región objetivo y las variantes expresadas de CDR de proteína de unión al antígeno seleccionadas para la combinación óptima de la actividad deseada. Las técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en ADN que tienen una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo, mutagénesis del cebador M13 y mutagénesis por PCR. La selección de los mutantes se realiza usando ensayos de actividades de proteína de unión al antígeno como se describe aquí.

Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de residuos individuales; las inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente uno (1) a aproximadamente veinte (20) residuos de aminoácidos, aunque pueden tolerarse inserciones considerablemente mayores. Las supresiones varían de aproximadamente uno (1) a aproximadamente veinte (20) residuos de aminoácidos, aunque en algunos casos las supresiones pueden ser mucho mayores.

5 Pueden usarse sustituciones, supresiones, inserciones o cualquier combinación de las mismas para llegar a una derivada o variante final. Generalmente, estos cambios se realizan en unos pocos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula, particularmente la inmunogenicidad y la especificidad de la proteína de unión al antígeno. Sin embargo, los cambios más grandes pueden ser tolerados en ciertas circunstancias.

10 Por "Fab" o "región Fab", como se usa en la presente memoria, se entiende el polipéptido que comprende los dominios de inmunoglobulina  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $V_L$  y  $C_L$ . Fab puede referirse a esta región aisladamente, o a esta región en el contexto de un anticuerpo de longitud completa, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión Fab, o cualquier otra realización de anticuerpo como se describe aquí.

15 Por "Fv" o "fragmento Fv" o "región Fv", como se usa en la presente memoria, se entiende un polipéptido que comprende los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo anticuerpo.

Por "marco" tal como se usa en la presente memoria, se entiende la región de un dominio variable de anticuerpo exclusivo de aquellas regiones definidas como CDR. Cada marco de dominio variable de anticuerpo puede subdividirse adicionalmente en las regiones contiguas separadas por las CDR (FR1, FR2, FR3 y FR4).

20 El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, BST1). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. 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 (véase FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993), (iv) un fragmento  $F_d$  que consiste en los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; (v) un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb [Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546], que consiste en un dominio  $V_H$ ; (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, y (viii) un Nanocuerpo, una región variable de cadena pesada que contiene un solo dominio variable y dos dominios constantes. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L/V_K$  y  $V_H$ , son codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite fabricarse como una única cadena proteica en la que las regiones  $V_L/V_K$  y  $V_H$  se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv)), véase, por ejemplo, Bird et al., (1988) Science 242: 423-426, y Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5888. Tales anticuerpos de cadena sencilla también están destinados a estar comprendidos dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

40 Un "anticuerpo aislado" tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al BST1 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes al BST1). Un anticuerpo aislado que se une específicamente al BST1 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de BST1 de otras especies. Además, y/o alternativamente un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos, que está en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza.

50 En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención son proteínas recombinantes, proteínas aisladas o proteínas sustancialmente puras. Una proteína "aislada" no está acompañada por al menos parte del material con el que está normalmente asociado en su estado natural, por ejemplo, constituyendo al menos aproximadamente 5%, o al menos aproximadamente 50% en peso de la proteína total en una muestra dada. Se entiende que la proteína aislada puede constituir de 5 a 99,9% en peso del contenido total de proteína dependiendo de las circunstancias. Por ejemplo, la proteína puede elaborarse a una concentración significativamente mayor mediante el uso de un promotor inducible o un promotor de alta expresión, de manera que la proteína se elabora a niveles de concentración superiores. En el caso de proteínas recombinantes, la definición incluye la producción de un anticuerpo en una amplia variedad de organismos y/o células huésped que son conocidos en la técnica en la que no se produce naturalmente.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" tal como se utilizan en la presente memoria 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 por un epítipo particular.

Como se usa en la presente memoria, un "anticuerpo policlonal" se refiere a anticuerpos producidos por varios clones de linfocitos B como sería el caso en un animal completo.

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

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

El término "derivados de anticuerpo" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo, por ejemplo, un conjugado (generalmente un enlace químico) del anticuerpo y otro agente o anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse con agentes, incluyendo, pero sin limitarse a, polímeros (por ejemplo, PEG), toxinas, marcadores, etc., tal como se describe más completamente a continuación. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser no humanos, quiméricos, humanizados o totalmente humanos. Para una divulgación de los conceptos de anticuerpos quiméricos y humanizados, véase Clark et al., (2000) y las referencias citadas en él (Clark, 2000, *Immunol Today* 21: 397-402). Los anticuerpos quiméricos comprenden la región variable de un anticuerpo no humano, por ejemplo, los dominios  $V_H$  y  $V_L$  originarios de ratón o rata, unidos operativamente a la región constante de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención son humanizados. Por anticuerpo "humanizado", como se usa en la presente memoria, se entiende un anticuerpo que comprende una región marco humana (FR) y una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano (usualmente de ratón o rata). El anticuerpo no humano que proporciona las CDR se denomina "donante" y la inmunoglobulina humana que proporciona el marco se denomina "aceptor". La humanización se basa principalmente en el injerto de CDR donante sobre marcos  $V_L$  y  $V_H$  aceptores (humanos) (Patente de Estados Unidos No. 5.225.539). Esta estrategia se conoce como "injerto de CDR". A menudo se requiere "retromutación" de residuos de marco aceptor seleccionados para los correspondientes residuos donantes para recuperar la afinidad que se pierde en el constructo injertado inicial (Patentes de los Estados Unidos Nos. 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762, 6.180.370, 5.859.205, 5.821.337, 6.407.213). El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana, y por lo tanto comprenderá típicamente una región Fc humana. Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica y pueden realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones et al., (1986) *Nature* 321: 522-525; Riechmann et al., (1988) *Nature* 332: 323-329; Verhoeven et al., (1988) *Science*, 239: 1534-1536]. También se conocen en la técnica ejemplos adicionales de anticuerpos monoclonales murinos humanizados, por ejemplo, anticuerpos que unen la proteína C humana (O'Connor et al., 1998, *Protein Eng.* 11: 321-8), el receptor de interleuquina 2 [Queen et al., (1989) *Proc Natl Acad Sci, USA* 86: 10029-33], y el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 [Carter et al., (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4285-9]. En una realización alternativa, los anticuerpos de la presente invención pueden ser totalmente humanos, es decir, las secuencias de los anticuerpos son completamente o sustancialmente humanas. Se conocen una serie de métodos en la técnica para generar anticuerpos completamente humanos, incluyendo el uso de ratones transgénicos [Bruggemann et al., (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8: 455-458] o bibliotecas de anticuerpos humanos acopladas con métodos de selección [Griffiths et al., (1998) *Curr Opin Biotechnol* 9: 102-108].

40 El término "anticuerpo humanizado" pretende incluir anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias marco humanas. Pueden hacerse modificaciones adicionales de la región marco dentro de las secuencias marco humana, tales como las modificaciones de aminoácidos del dominio Fc, como se describe en la presente memoria.

45 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 región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el que las secuencias de región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de región constante se derivan de un anticuerpo humano.

El término "se une específicamente" (o "se une inmunoespecíficamente") no pretende indicar que un anticuerpo se une exclusivamente a su objetivo deseado, aunque en muchas realizaciones esto será cierto; es decir, un anticuerpo "se une específicamente" a su objetivo y no se une de forma detectable o sustancialmente a otros componentes en la muestra, célula o paciente. Sin embargo, en algunas realizaciones, un anticuerpo "se une específicamente" si su afinidad por su objetivo pretendido es aproximadamente 5 veces mayor cuando se compara con su afinidad por una molécula no objetivo. Adecuadamente, no hay reacción cruzada significativa o unión cruzada con sustancias no deseadas, especialmente proteínas o tejidos naturales de una persona o animal sanos. La afinidad del anticuerpo será, por ejemplo, al menos aproximadamente 5 veces, tal como 10 veces, tal como 25 veces, especialmente 50 veces, y particularmente 100 veces o más, mayor para una molécula objetivo que su afinidad por una molécula no objetivo. En algunas realizaciones, la unión específica entre un anticuerpo u otro agente de unión y un antígeno significa una afinidad de unión de al menos  $10^6 M^{-1}$ . Los anticuerpos pueden, por ejemplo, unirse con afinidades de al menos aproximadamente  $10^7 M^{-1}$ , tal como entre aproximadamente  $10^8$  a  $8M^{-1}$  hasta aproximadamente  $10^9 M^{-1}$  hasta aproximadamente  $10^{10} M^{-1}$ , o aproximadamente  $10^{10} M^{-1}$  a aproximadamente  $10^{11} M^{-1}$ . Los anticuerpos pueden, por ejemplo, unirse con una  $EC_{50}$  de 50 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o

más preferiblemente 10 pM o menos.

El término "no se une sustancialmente" a una proteína o células, como se usa en la presente memoria, 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, más preferiblemente  $1 \times 10^{-5}$  M o más, más preferiblemente  $1 \times 10^{-4}$  M o más, más preferiblemente  $1 \times 10^{-3}$  M o más, incluso más preferiblemente  $1 \times 10^{-2}$  M o más.

El término " $EC_{50}$ ", tal como se usa en la presente memoria, pretende referirse a la potencia de un compuesto cuantificando la concentración que conduce al 50% de respuesta/efecto máximo.  $EC_{50}$  puede determinarse mediante Scratchard o FACS.

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

Tal como se usa en la presente memoria, el término "alta afinidad" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos, más preferiblemente  $5 \times 10^{-8}$  M o menos, incluso más preferiblemente  $1 \times 10^{-8}$  M o menos, incluso más preferiblemente  $5 \times 10^{-9}$  M o menos e incluso más preferiblemente  $1 \times 10^{-9}$  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 un  $K_D$  de  $10^{-6}$  M o menos, más preferiblemente  $10^{-7}$  M o menos, incluso más preferiblemente  $10^{-8}$  M o menos.

El término "epitopo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio sobre un antígeno al que se une específicamente una inmunoglobulina o anticuerpo. Los epítomos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos se retienen típicamente por exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítomos formados por plegamiento terciario se pierden típicamente en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítopo 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 epítomos incluyen técnicas en el arte y aquéllas descritas en la presente memoria, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional [véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)].

Por consiguiente, también se divulgan en la presente memoria anticuerpos que se unen (es decir, reconocen) al mismo epítopo que los anticuerpos descritos en la presente memoria (es decir, BST1\_A2, BST1\_A1 y BST1\_A3). Los anticuerpos que se unen al mismo epítopo pueden identificarse mediante 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 epítomos idénticos o estructuralmente similares (por ejemplo, epítomos de superposición), o epítomos espacialmente proximales que, cuando se unen, causan impedimento estérico entre los anticuerpos.

La inhibición competitiva puede determinarse usando ensayos de rutina en los que la inmunoglobulina sometida a ensayo 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 competencia en sándwich [véase Stahl et al., (1983) *Methods in Enzymology* 9: 242]; EIA con biotina-avidina directa en fase sólida [véase Kirkland et al., (1986) *J. Immunol.* 137: 3614]; ensayo marcado directo en fase sólida, un ensayo en sándwich marcado directo en fase sólida [véase Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press]; RIA de marcación directa en fase sólida usando el marcador I-125 [véase Morel et al., (1988) *Mol. Immunol.* 25(1): 7]; EIA con biotina-avidina directa en fase sólida [Cheung et al., (1990) *Virology* 176: 546]; y RIA marcado directa. [Moldenhauer et al., (1990) *Scand. J. Immunol.* 32: 77]. Típicamente, dicho ensayo implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que portan cualquiera de estas, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Por lo general, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso. Normalmente, cuando un anticuerpo competidor está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común en al menos 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 de rayos X de cristales de complejos de antígeno: anticuerpo que proporcionan la resolución atómica del epítopo. Otros métodos monitorean la unión del anticuerpo a fragmentos de antígeno o variaciones mutadas del antígeno donde la pérdida de unión debida a una modificación de un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de antígeno se considera a menudo una

5 indicación de un componente de epítipo. Además, también pueden usarse métodos combinatorios computacionales para el mapeo de epítipos. Estos métodos se basan en la capacidad del anticuerpo de interés para aislar por afinidad péptidos cortos específicos de bibliotecas combinadas de péptidos de despliegue en fagos. Los péptidos se consideran entonces como conductores para la definición del epítipo correspondiente al anticuerpo usado para  
cribar la biblioteca de péptidos. Para el mapeo de epítipos, también se han desarrollado algoritmos computacionales que han demostrado mapear epítipos conformacionales discontinuos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

10 La divulgación se describe con más detalle en las siguientes subsecciones.

#### Anticuerpos anti-BST1

15 Los anticuerpos de la invención se caracterizan por rasgos o propiedades funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen específicamente al BST1 humano. Preferiblemente, un anticuerpo de la invención se une al BST1 con alta afinidad, por ejemplo, con un  $K_D$  de  $8 \times 10^{-7}$  M o menos, incluso más típicamente  $1 \times 10^{-8}$  M o menos. Los anticuerpos anti-BST1 de la invención presentan preferiblemente una o más de las siguientes características, con anticuerpos que exhiben ambos un hallazgo de uso particular:

se une al BST1 humano con una  $EC_{50}$  de 50 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o más preferiblemente 10 pM o menos;

se une a las células humanas que expresan el BST1.

20 En una realización, los anticuerpos se unen preferiblemente a un epítipo antigénico presente en BST1, cuyo epítipo no está presente en otras proteínas. Preferiblemente, los anticuerpos no se unen a proteínas relacionadas, por ejemplo, los anticuerpos no se unen sustancialmente a otras moléculas de adhesión celular. En una realización, el anticuerpo puede internalizarse en una célula que expresa el BST1. Los ensayos estándar para evaluar la internalización de anticuerpos son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ensayos de internalización de MabZap o HumZap.

25 Los ensayos estándar para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos frente al BST1 pueden realizarse a nivel de proteína o celular y son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ensayos ELISA, transferencias Western, RIA, BIAcore® y análisis de citometría de flujo. Los ensayos adecuados se describen en detalle en los Ejemplos. La cinética de unión (por ejemplo, afinidad de unión) de los anticuerpos también se puede evaluar mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tal como por análisis de sistema Biacore®. Para evaluar la unión a células tumorales de células B de Raji o Daudi, se pueden obtener células de Raji (ATCC depósito No. CCL-86) o Daudi (ATCC depósito No. CCL-213) a partir de fuentes públicamente disponibles tales como American Type Culture Collection, y se usan en ensayos estándar, tales como análisis de citometría de flujo.

#### Anticuerpos monoclonales de la invención

35 El anticuerpo de la invención es el anticuerpo monoclonal BST1\_A2. También se describe el anticuerpo BST1\_A1 aislado y estructuralmente caracterizado como se describe en los Ejemplos 1-4. Las secuencias de aminoácidos de  $V_H$  BST1\_A2, BST1\_A1 y BST1\_A3 se muestran en las SEQ ID NOs: 2, 1 y 52, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de  $V_K$  BST1\_A2, BST1\_A1 y BST1\_A3 se muestran en las SEQ ID NO: 4, 3 y 53, respectivamente.

40 Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse al BST1, las secuencias de  $V_H$  y  $V_K$  pueden ser "mezcladas y emparejadas" para crear otras moléculas de unión anti-BST1. La unión de BST1 de tales anticuerpos "mezclados y emparejados" puede probarse usando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo, ELISA). Preferiblemente, cuando las cadenas  $V_H$  y  $V_K$  son mezcladas y emparejadas, una secuencia de  $V_H$  de un par  $V_H/V_K$  particular se reemplaza con una secuencia  $V_H$  estructuralmente similar. De manera similar, preferiblemente una secuencia de  $V_K$  de un par  $V_H/V_K$  particular se reemplaza con una secuencia de  $V_K$  estructuralmente similar.

45 Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo, que comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una SEQ ID NO: 4; en donde el anticuerpo se une específicamente al BST1, preferiblemente al BST1 humano.

Otras combinaciones de cadena pesada y ligera descritas en la presente memoria incluyen:

50 una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3; o

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 52 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 53.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1, las CDR2 y las CDR3 de cadena pesada y cadena ligera de BST1\_A2. También se describen anticuerpos que comprenden las CDR1, las CDR2 y las CDR3 de cadena pesada y cadena ligera de BST1\_A1 y BST1\_A3, o combinaciones de los mismos. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 V<sub>H</sub> de BST1\_A2, BST1\_A1 y BST1\_A3 se muestran en las SEQ ID NO: 10, 9 y 56, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 V<sub>H</sub> de BST1\_A2, BST1\_A1 y BST1\_A3 se muestran en SEQ ID NO: 12 o 51, 11 y 57, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 V<sub>H</sub> de BST1\_A2, BST1\_A1 y BST1\_A3 se muestran en SEQ ID NO: 14, 13 y 58, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1 V<sub>K</sub> de BST1\_A2, BST1\_A1 y BST1\_A3 se muestran en SEQ ID NO: 16, 15 y 59, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 V<sub>K</sub> de BST1\_A2, BST1\_A1 y BST1\_A3 se muestran en SEQ ID NO: 18, 17 y 60, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 V<sub>K</sub> de BST1\_A2, BST1\_A1 y BST1\_A3 se muestran en las SEQ ID NO: 20, 19 y 61, respectivamente. Las regiones CDR se delimitan utilizando el sistema de Kabat [Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, NIH Publicación No. 91-3242].

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede unirse al BST1 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 V<sub>H</sub> y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 V<sub>K</sub> pueden ser "mezcladas y emparejadas" (es decir, CDR de diferentes anticuerpos se pueden mezclarse y emparejarse, aunque cada anticuerpo generalmente contiene una CDR1, CDR2 y CDR3 V<sub>H</sub> y una CDR1, CDR2 y CDR3 V<sub>K</sub>) para crear otras moléculas de unión a anti-BST1.

La unión de BST1 de tales anticuerpos "mezclados y emparejados" puede probarse usando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos (por ejemplo, ELISA, análisis Biacore®). Preferiblemente, cuando se mezclan y se emparejan secuencias de CDR V<sub>H</sub>, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia particular de V<sub>H</sub> se reemplaza con una secuencia o secuencias de CDR estructuralmente similares. Del mismo modo, cuando se mezclan y se emparejan secuencias de CDR V<sub>K</sub>, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia particular de V<sub>K</sub> preferiblemente se reemplaza con una secuencia o secuencias de CDR estructuralmente similares. Será fácilmente evidente para el especialista en la materia que se pueden crear nuevas secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>K</sub> sustituyendo una o más secuencias de la región CDR V<sub>H</sub> y/o V<sub>L</sub>/V<sub>K</sub> con secuencias estructuralmente similares de las secuencias de CDR descritas en la presente memoria para anticuerpos monoclonales BST1\_A2, BST1\_A1 y BST1\_A3.

Por consiguiente, aquí se describe un anticuerpo monoclonal aislado, o porción del mismo de unión al antígeno que comprende:

una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 10, 9 y 56;

una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12 o 51, 11 y 57;

una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 14, 13 y 58;

una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 16, 15 y 59;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 18, 17 y 60; y

una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 20, 19 y 61;

siendo posibles todas las combinaciones permisibles, en las que el anticuerpo se une específicamente al BST1, preferiblemente al BST1 humano.

En una realización preferida, el anticuerpo posee:

una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 10;

una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 51;

una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 14; y

una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 16;

una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 18;

una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 20.

En otro ejemplo, el anticuerpo posee:

- una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 9;
- una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 11;
- una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 13; y
- 5 una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 15;
- una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 17;
- una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 19.

En otro ejemplo, el anticuerpo posee:

- una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 56;
- 10 una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 57;
- una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 58; y
- una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 59;
- una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 60;
- una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 61.

15 Es bien conocido en la técnica que el dominio de CDR3, independientemente del dominio o dominios de CDR1 y/o CDR2, puede determinar por sí solo la especificidad de unión de un anticuerpo por un antígeno afin y que se pueden generar predeciblemente anticuerpos múltiples que tienen la misma especificidad de unión basada en una secuencia común de CDR3. Véase, por ejemplo, Klimka et al. (2000) *British J. of Cancer* 83 (2): 252-260 (que divulga la producción de un anticuerpo anti-CD30 humanizado usando solo el dominio variable de cadena pesada de CDR3 del anticuerpo Ki-4 anti-CD30 murino); Beiboer et al. (2000) *J. Mol. Biol.* 296: 833-849 (que divulga los anticuerpos recombinantes de la glicoproteína epitelial 2 (EGP-2) usando sólo la secuencia de CDR3 de cadena pesada del anticuerpo parental anti-EGP-2 MOC-31); Rader et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 8910-8915 (que divulga un panel de anticuerpos anti-integrina  $\alpha\beta 3$  humanizados usando un dominio de CDR3 variable de cadena pesada y ligera de un anticuerpo anti-integrina  $\alpha\beta 3$  de murino LM609 en donde cada anticuerpo miembro comprende una secuencia distinta fuera del dominio de CDR3 y capaz de unirse al mismo epítipo como el anticuerpo murino parental con afinidades tan altas o más altas que el anticuerpo murino parental); Barbas et al. (1994) *J. Am. Chem. Soc.* 116: 2161-2162 (revelando que el dominio de CDR3 proporciona la contribución más significativa a la unión al antígeno); Barbas et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 2529-2533 (que divulga el injerto de secuencias de CDR3 de cadena pesada de tres Fab (SI-1, SI-40 y SI-32) contra ADN placentario humano sobre la cadena pesada de un Fab toxoide antitetánico, reemplazando así la CDR3 existente de cadena pesada y demostrando que el dominio de CDR3 solo confería especificidad de unión); y Ditzel et al. (1996) *J. Immunol.* 157: 739-749 (que divulga los estudios de injerto en los que la transferencia de sólo CDR3 de cadena pesada de un Fab LNA3 poliespecífico parental a una cadena pesada de un anticuerpo IgG monoespecífico de Fab p313 de unión al toxoide del tétanos fue suficiente para retener la especificidad de unión del Fab parental).

35 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios de CDR3 de 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 al BST1. En ciertos ejemplos, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios de CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón o rata, en donde el anticuerpo monoclonal es capaz de unirse específicamente al BST1. En algunos ejemplos, dichos anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios de CDR3 de 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) tienen una afinidad de unión similar como el anticuerpo parental no humano correspondiente.

45 En otros ejemplos, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios de CDR3 de 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 al BST1. En otros ejemplos, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios de CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un primer anticuerpo humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal no humano, en donde el primer anticuerpo humano es capaz de unirse específicamente al BST1 y en donde el dominio de CDR3 del primer anticuerpo humano reemplaza un dominio de CDR3 en un anticuerpo humano que carece de especificidad de unión por el BST1 para generar un segundo anticuerpo humano que es capaz de unirse específicamente al BST1. En algunos ejemplos, dichos anticuerpos de la invención que comprenden uno o más dominios de CDR3 de cadena pesada y/o ligera del primer anticuerpo

humano (a) son capaces de competir por la unión con; (b) conservar las características funcionales; (c) unirse al mismo epítipo; y/o (d) tienen una afinidad de unión similar que el primer anticuerpo humano parental correspondiente.

Anticuerpos que tienen secuencias germinales particulares

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

10 Por ejemplo, en una realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción del mismo de unión al antígeno, que comprende una región variable de cadena pesada que es el producto de, o derivado de, un gen de V<sub>H</sub>1-39 murino, un gen de V<sub>H</sub>1-80 murino o un gen de V<sub>H</sub>69-1 murino, en el que el anticuerpo se une específicamente al BST1. En aún otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción del mismo de unión al antígeno, que comprende una región variable de cadena ligera que es el producto o derivado de un gen de V<sub>K</sub>4-55 murino, un gen de V<sub>K</sub>4-74 murino o un gen de V<sub>K</sub>44-1 murino, en donde el anticuerpo se une específicamente al BST1.

- 15 En aún otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción del mismo de unión al antígeno, en donde el anticuerpo:

20 comprende una región variable de cadena pesada que es el producto o derivado de un gen de V<sub>H</sub>1-39 murino (cuyo gen incluye la secuencia de nucleótidos expuesta en las SEQ ID NOs: 35 y 36); comprende una región variable de cadena ligera que es el producto o derivado de un gen de V<sub>K</sub>4-55 de murino (cuyo gen incluye las secuencias de nucleótidos expuestas en las SEQ ID NOs: 40, 41 y 42); y se une específicamente al BST1, preferiblemente al BST1 humano. Ejemplos de anticuerpos que tienen genes de V<sub>H</sub>1-39 y V<sub>K</sub>4-55, con secuencias descritas anteriormente, son BST1\_A2.

En aún otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción del mismo de unión al antígeno, en donde el anticuerpo:

- 25 comprende una región variable de cadena pesada que es el producto o derivado de un gen de V<sub>H</sub>1-80 murino (cuyo gen incluye la secuencia de nucleótidos expuesta en las SEQ ID NOs: 33 y 34); comprende una región variable de cadena ligera que es el producto o derivado de un gen de V<sub>K</sub>4-74 murino (cuyo gen incluye las secuencias de nucleótidos expuestas en las SEQ ID NOs: 37, 38 y 39); y se une específicamente al BST1, preferiblemente al BST1 humano. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene genes de V<sub>H</sub>1-80 y V<sub>K</sub>4-74, con secuencias descritas anteriormente, es BST1\_A1.

- 30 En aún otra realización preferida, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción del mismo de unión al antígeno, en donde el anticuerpo:

35 comprende una región variable de cadena pesada que es el producto o derivado de un gen de V<sub>H</sub>69-1 murino (cuyo gen incluye la secuencia de nucleótidos expuesta en las SEQ ID NOs: 68 y 69); comprende una región variable de cadena ligera que es el producto o derivado de, un gen de V<sub>K</sub>44-1 murino (cuyo gen incluye las secuencias de nucleótidos expuestas en las SEQ ID NOs: 70, 71 y 72); y se une específicamente al BST1, preferiblemente al BST1 humano. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene genes de V<sub>H</sub> y V<sub>K</sub>, con secuencias descritas anteriormente, es BST1\_A3.

- 40 Tal como se usa en la presente memoria, un anticuerpo comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de línea germinal particular si las regiones variables del anticuerpo se obtienen a partir de un sistema que usa genes de inmunoglobulina de línea germinal murina. Tales sistemas incluyen el cribado de una biblioteca de genes de inmunoglobulina murina desplegada en fagos con el antígeno de interés. Un anticuerpo que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal murina puede identificarse como tal comparando la secuencia de nucleótidos o aminoácidos del anticuerpo con las secuencias de nucleótidos o aminoácidos de inmunoglobulinas de línea germinal murina y seleccionando la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal murina que está más próxima en la secuencia (es decir, el mayor % de identidad) a la secuencia del anticuerpo. Un anticuerpo que es "el producto de" o "derivado de" una secuencia particular de inmunoglobulina de línea germinal murina puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido, por ejemplo, a mutaciones somáticas naturales o introducción intencional de mutación dirigida al sitio. Sin embargo, un anticuerpo seleccionado típicamente es al menos 90% idéntico en secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal murina y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo como murino cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de la línea germinal humana). En ciertos casos, un anticuerpo puede ser al 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 de la línea germinal. Típicamente, un anticuerpo derivado de una secuencia de línea germinal murina particular mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal murina. En

ciertos casos, el anticuerpo puede mostrar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de la inmunoglobulina de la línea germinal.

#### Anticuerpos homólogos

5 En aún otro ejemplo, un anticuerpo de la divulgación comprende regiones variables de 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 memoria, y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de la anticuerpos anti-BST1 de la invención.

10 Por ejemplo, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción del mismo de unión al antígeno, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en donde: la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 2, 1 y 52; la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 4, 3 y 53; y el anticuerpo se une a BST1 humano. Tales anticuerpos pueden unirse a BST1 humano con una  $EC_{50}$  de 50 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o más preferiblemente 10 pM o menos.

El anticuerpo también puede unirse a células CHO transfectadas con el BST1 humano.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

20 En otras realizaciones, las secuencias aminoácidos de  $V_H$  y/o  $V_K$  pueden ser 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homólogas a las secuencias expuestas anteriormente. Se puede obtener un anticuerpo que tiene regiones  $V_H$  y  $V_K$  con alta identidad (es decir, 80% o superior) a las regiones  $V_H$  y  $V_K$  de las secuencias expuestas anteriormente, por mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican las SEQ ID NOs: 6, 5, 8, 7, 54 y 55, seguida por la prueba del anticuerpo alterado codificado para la función retenida usando los ensayos funcionales descritos en la presente memoria.

25 El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = # de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que debe introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede llevar a cabo usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitativos a continuación.

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

40 Adicionalmente o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente invención pueden usarse además como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Dichas búsquedas se pueden realizar utilizando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al., (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10. Las búsquedas de proteínas por BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpo de la invención. Para obtener alineaciones con huecos para propósitos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25 (17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

#### Anticuerpos con Modificaciones Conservadoras

50 En ciertos ejemplos, un anticuerpo de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias de CDR comprenden secuencias especificadas de aminoácidos basadas en los anticuerpos preferidos descritos en la presente memoria (por ejemplo, BST1\_A2, BST1\_A1 y BST1\_A3), o modificaciones conservadoras de los mismos, y en donde los anticuerpos conservan las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-BST1 de la invención. De acuerdo con ello, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción del mismo de unión al antígeno, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3, en donde: la secuencia de CDR3 de región variable de

cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 14, 13 y 58 y sus modificaciones conservadoras; la secuencia de CDR3 de región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 20, 19 y 61, y sus modificaciones conservadoras; y el anticuerpo se une a BST1 humano con una  $EC_{50}$  de 50 nM o menos, 10 nM o menos, 1 nM o menos, 100 pM o menos, o más preferiblemente 10 pM o menos.

El anticuerpo también puede unirse a células CHO transfectadas con BST1 humano.

En una realización preferida, la secuencia de CDR2 de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 12 o 51 y sus modificaciones conservadoras; y la secuencia de CDR2 de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18 y sus modificaciones conservadoras. En otra realización preferida, la secuencia de CDR1 de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y sus modificaciones conservadoras; y la secuencia de CDR1 de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y sus modificaciones conservadoras. En otra realización preferida, la secuencia de CDR3 de la región variable de cadena pesada comprende un aminoácido de la SEQ ID NO: 14 y sus modificaciones conservadoras; y la secuencia de CDR3 de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20, y sus modificaciones conservadoras.

En una realización preferida, la secuencia de CDR2 de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 12 o 51, y sus modificaciones conservadoras; y la secuencia de CDR2 de la región variable de cadena ligera comprende un aminoácido de la SEQ ID NO: 18, y sus modificaciones conservadoras. En otra realización preferida, la secuencia de CDR1 de la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y sus modificaciones conservadoras; y la secuencia de CDR1 de la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, y sus modificaciones conservadoras.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "modificaciones de secuencia conservadoras" pretende referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Dichas modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones de aminoácidos. Pueden introducirse modificaciones en un anticuerpo de la invención mediante técnicas estándar conocidas en el arte, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son aquellas en las que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De este modo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención pueden ser reemplazados con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el anticuerpo alterado puede ser ensayado para la función retenida usando los ensayos funcionales descritos en la presente memoria.

Las secuencias de CDR1 de cadena pesada de las SEQ ID NOs: 10, 9 y 56 pueden comprender una o más modificaciones de secuencia conservadoras, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos; las secuencias de CDR1 de cadena ligera de las SEQ ID NO: 16, 15 y 59 pueden comprender una o más modificaciones conservadoras de la secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos; las secuencias de CDR2 de cadena pesada mostradas en las SEQ ID NOs: 12 o 51, 11 y 57 pueden comprender una o más modificaciones de la secuencia conservadora, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos; las secuencias de CDR2 de cadena ligera mostradas en las SEQ ID NOs: 18, 17 y 60 pueden comprender una o más modificaciones conservadoras de la secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos; las secuencias de CDR3 de cadena pesada mostradas en las SEQ ID NOs: 14, 13 y 58 pueden comprender una o más modificaciones conservadoras de la secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos; y/o las secuencias de CDR3 de cadena ligera mostradas en las SEQ ID NOs: 20, 19 y 61 pueden comprender una o más modificaciones conservadoras de la secuencia, tales como una, dos, tres, cuatro, cinco o más sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos.

Anticuerpos que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos anti-BST1 de la invención

En otro ejemplo, la divulgación proporciona anticuerpos que se unen al mismo epítipo en el BST1 humano como cualquiera de los anticuerpos monoclonales BST1 de la invención (es decir, anticuerpos que tienen la capacidad de competir de forma cruzada por la unión al BST1 con cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la invención). En un ejemplo, el anticuerpo de referencia para estudios de competencia cruzada puede ser el anticuerpo monoclonal BST1\_A2 (que tiene secuencias de  $V_H$  y  $V_K$  como se muestra en las SEQ ID NOs: 2 y 4, respectivamente), el anticuerpo monoclonal BST1\_A1 (que tiene secuencias de  $V_H$  y  $V_K$  como se muestra en las SEQ ID NOs: 1 y 3, respectivamente), el anticuerpo monoclonal BST1\_A3 (que tiene secuencias de  $V_H$  y  $V_K$  como se muestra en las SEQ ID NOs: 52 y 53, respectivamente).

Tales anticuerpos de competencia cruzada pueden identificarse basándose en su capacidad para competir en forma cruzada con BST1\_A2, BST1\_A1 y BST1\_A3 en ensayos de unión a BST1 convencionales. Por ejemplo, se puede usar el análisis BIAcore, ensayos ELISA o citometría de flujo para demostrar la competencia cruzada con los anticuerpos de la presente invención. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de, por ejemplo, BST1\_A2, BST1\_A1 y BST1\_A3, a BST1 humano demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con BST1\_A2, BST1\_A1 o BST1\_A3 para la unión a BST1 humano y por lo tanto se une al mismo epítipo en BST1\_A2, BST1\_A1 o BST1\_A3 humano.

#### Anticuerpos modificados y alterados genéticamente

Un anticuerpo de la invención se puede preparar usando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de  $V_H$  y/o  $V_L$  divulgadas en la presente memoria que pueden usarse como material de partida para alterar genéticamente un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas en comparación con el anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede alterarse genéticamente modificando uno o más aminoácidos dentro de una o ambas regiones variables (por ejemplo,  $V_H$  y/o  $V_L$ ), por ejemplo, dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones marco. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede ser alterado genéticamente modificando residuos dentro de la región o regiones constantes, por ejemplo, para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo.

En ciertas realizaciones, el injerto de CDR se puede usar para alterar genéticamente regiones variables de anticuerpos. Los anticuerpos interactúan con antígenos objetivo predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y ligera (CDR). 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 antígeno-anticuerpo, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos específicos de origen natural construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo específico de origen natural injertado sobre secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. y otros (1998) *Nature* 332: 323-327, Jones, P. et al., (1986) *Nature* 321: 522-525, Queen, C. et al., (1989) *Proc. Nat. Acad. USA* 86: 10029-10033; Patente de Estados Unidos No. 5.225.539 de Winter y las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.,).

Por consiguiente, otra realización de la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o porción del mismo de unión al antígeno, que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 10, 12 o 51; y 14, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 16; 18; y 20, respectivamente. Por lo tanto, tales anticuerpos contienen las secuencias de CDR  $V_H$  y  $V_K$  de anticuerpos monoclonales BST1\_A2, incluso 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 de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal para los genes de regiones variables de cadena pesada y ligera de murino se pueden encontrar en la base de datos de secuencias de línea germinal de murinos IMGT (International ImMunoGeneTics) (disponible en el protocolo de transferencia de hipertexto//[www.imgt.cines.fr/](http://www.imgt.cines.fr/)?), así como en Kabat, EA, et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, NIH publicación No. 91-3242. Como otro ejemplo, las secuencias de ADN de línea germinal para genes de regiones variables de cadena pesada y ligera de murino se pueden encontrar en la base de datos del GenBank.

Las secuencias de proteínas de anticuerpos se comparan con una base de datos de secuencias de proteínas compiladas utilizando uno de los métodos de búsqueda de similitud de secuencia denominado Gapped BLAST [Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402], que es bien conocido por los expertos en la técnica. BLAST es un algoritmo heurístico en el que es probable que una alineación estadísticamente significativa entre la secuencia del anticuerpo y la secuencia de bases de datos contenga pares de segmentos de alta puntuación (HSP) de palabras alineadas. Los pares de segmentos cuyos puntajes no pueden ser mejorados por extensión o recorte se llaman un acierto. Brevemente, las secuencias de nucleótidos en la base de datos se traducen y se mantiene la región entre y que incluye la región marco FR1 a FR3. Las secuencias de bases de datos tienen una longitud media de 98 residuos. Se eliminan las secuencias duplicadas que son coincidencias exactas sobre toda la longitud de la

proteína. Una búsqueda por BLAST para proteínas utilizando el programa blastp con parámetros estándar predeterminados, excepto el filtro de baja complejidad, que está desactivado, y la matriz de sustitución de BLOSUM62, filtra los 5 primeros aciertos 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 de correspondencia de la secuencia de base de datos se considera el acierto 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 en la base de datos traducida dinámicamente en los seis marcos.

Las identidades son concordancias exactas de aminoácidos entre la secuencia del anticuerpo y la base de datos de la proteína en toda la longitud de la secuencia. Los positivos (identidades + coincidencia de sustitución) no son idénticos, sino sustituciones de aminoácidos guiados por la matriz de sustitución BLOSUM62. Si la secuencia del anticuerpo coincide con dos de las secuencias de la base de datos con la misma identidad, el acierto con la mayoría de los positivos se decidiría que sería el acierto de la secuencia coincidente.

Las secuencias marco preferidas para uso en los anticuerpos de la invención son aquellas que son estructuralmente similares a las secuencias marco utilizadas por los anticuerpos seleccionados de la invención, por ejemplo, similares a la secuencia marco 1-80 de  $V_H$ , la secuencia marco 1-39 de  $V_H$ , la secuencia marco 4-74 de  $V_K$  y/o las secuencias marco 4-55 de  $V_K$  utilizadas por los anticuerpos monoclonales preferidos de la invención. Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_H$  y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de  $V_K$  pueden injertarse en regiones marco que tienen la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de la inmunoglobulina de línea germinal a partir de la cual se deriva la secuencia marco o las secuencias de CDR se pueden injertar en regiones marco que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos es beneficioso mutar restos dentro de las regiones marco para mantener o mejorar la capacidad de unión del antígeno del anticuerpo (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.530.101, 5.585.089, 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.).

Otro tipo de modificación de región variable es mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR1, CDR2 y/o CDR3 de  $V_H$  y/o  $V_K$  para mejorar de este modo una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. La mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis mediada por PCR pueden realizarse para introducir la mutación o mutaciones y el efecto sobre la unión al anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, puede evaluarse en ensayos *in vitro* e *in vivo* como se describe aquí y se proporciona en los Ejemplos. En algunos ejemplos, se introducen modificaciones conservadoras (como se ha discutido anteriormente). Alternativamente, se pueden hacer modificaciones no conservadoras. Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos, pero son preferiblemente sustituciones. Además, típicamente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR, aunque, tal como se apreciará por los expertos en la técnica, las variantes en otras áreas (regiones marco, por ejemplo) pueden ser mayores.

Por consiguiente, en otro ejemplo, la presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales anti-BST1 aislados, o sus porciones de unión al antígeno, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende: (a) una región CDR1 de  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 10, 9 y 56 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 10, 9 y 56; (b) una región CDR2 de  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 12 o 51, 11 y 57, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 12 o 51, 11 y 57; (c) una región CDR3 de  $V_H$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 14, 13 y 58, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 14, 13 y 58; (d) una región CDR1 de  $V_K$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 16, 15 y 59, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 16, 15 y 59; (e) una región CDR2 de  $V_K$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 18, 17 y 60, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 18, 17 y 60; y (f) una región CDR3 de  $V_K$  que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 20, 19 y 61, o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos en comparación con las SEQ ID NOs: 20, 19 y 61.

Los anticuerpos modificados genéticamente de la divulgación incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones a residuos en el marco dentro de  $V_H$  y/o  $V_K$ , por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, tales modificaciones del marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es para "retromutar" uno o más residuos del marco a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos del marco que difieren de la secuencia de la línea germinal a partir de la cual se deriva el anticuerpo. Dichos residuos se pueden identificar comparando las secuencias del marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las que se deriva el anticuerpo.

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 para reducir de ese modo la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque se denomina también "desinmunización" y se describe con más detalle en la publicación de la patente de estados Unidos No. 2003/0153043.

5 Además, o de manera alternativa a las modificaciones hechas dentro de las regiones marco o CDR, los anticuerpos de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la semivida en suero, fijación del complemento, unión al receptor Fc y/o citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede ser modificado químicamente (por ejemplo, una o más fracciones químicas pueden estar unidas al anticuerpo) o ser modificado para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con más detalle a continuación. La numeración de residuos en la región Fc es la del índice EU de Kabat.

15 En una realización, la región bisagra de C<sub>H</sub>1 se modifica de manera que el número de residuos de cisteína en la región bisagra se altera, por ejemplo, aumenta o disminuye. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de Estados Unidos No. 5.677.425. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de C<sub>H</sub>1 se altera, por ejemplo, para facilitar el montaje de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

20 En otra realización, la región bisagra Fc de un anticuerpo está mutada para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfaz del dominio C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 del fragmento de bisagra Fc de tal manera que el anticuerpo tenga una unión desmejorada de la proteína A estafilocócica (SpA) con respecto a la unión de SpA de dominio de bisagra Fc nativa. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos No. 6.165.745.

25 En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Diversos enfoques son posibles. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.277.375. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región C<sub>H</sub>1 o C<sub>L</sub> para contener un epítomo de unión al receptor de salvamento tomado de dos bucles de un dominio C<sub>H</sub>2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.869.046 y 6.121.022.

30 En otra realización, el anticuerpo se produce como un Unicuerpo tal como se describe en el documento WO2007/059782.

35 En aún otras realizaciones, la región Fc se altera reemplazando al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados entre los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden ser reemplazados por un residuo de aminoácido diferente de tal manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector, pero conserva la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo progenitor. El ligando efector al que se le altera 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 Estados Unidos Nos. 5.624.821 y 5.648.260.

40 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 tenga una unión al C1q alterada y/o una citotoxicidad dependiente del complemento(CDC) reducida o suprimida. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de Estados Unidos No. 6.194.551.

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

45 En otro ejemplo más, 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 por un receptor Fcγ 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 adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072 por Presta. Además, se han mapeado los sitios de unión en IgG1 humana para FcγR1, FcγR2, FcγR3 y FcγR4 y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields, RL et al. (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-6604). Se demostró que las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la unión a FcγR3. Además, se demostró que los siguientes mutantes de combinación mejoran la unión a FcγR3: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A. Otras variantes del ADCC se describen, por ejemplo, en el documento WO2006/019447.

En otro ejemplo más, la región Fc se modifica para aumentar la semivida del anticuerpo, generalmente aumentando la unión al receptor FcRn, como se describe por ejemplo en el documento PCT/US2008/088053, las patentes de

Estados Unidos Nos. 7.371.826, 7.670.600 y el documento WO 97/34631. En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Diversos enfoques son posibles. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región C<sub>H</sub>1 o C<sub>L</sub> para contener un epítipo de unión al receptor de salvamento tomado de dos bucles de un dominio C<sub>H</sub>2 de una región Fc de una IgG, tal como se describe en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.869.046 y 6.121.022.

En aún otra realización, la glicosilación de un anticuerpo se modifica. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo que carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos que resultan en la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región variable para eliminar de este modo la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe con más detalle en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.714.350 y 6.350.861 de Co et al., y puede llevarse a cabo eliminando la asparagina en la posición 297.

Adicional o alternativamente, se puede elaborar un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene más estructuras de GlcNac bisectantes. Esto a veces se denomina en la técnica como una "glicofoma modificada genéticamente". Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de anticuerpos. Tales modificaciones de hidratos de carbono pueden realizarse generalmente de dos maneras; por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo se expresa en una célula huésped con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y pueden usarse como células huésped en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Se hace referencia a la tecnología POTELLIGENT®. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen fucosiltransferasa, FUT8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa), de forma 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 por la ruptura dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 usando dos vectores de reemplazo [véase la publicación de patente de Estados Unidos No. 2004/0110704, la patente de Estados Unidos No. 7.517.670 y Yamane-Ohnuki et al. (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87: 614-22]. Como otro ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hanai et al. describe una línea celular con un gen FUT8 perturbado funcionalmente, que codifica una fucosiltransferasa, de tal manera que los anticuerpos expresados en dicha línea celular presentan hipofucosilación reduciendo o eliminando la enzima relacionada con el enlace alfa 1,6. Hanai et al. describen también 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 que no tiene la actividad enzimática, por ejemplo la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). Alternativamente, las glicofomas modificadas por ingeniería genética, particularmente la afucosilación, se pueden hacer usando inhibidores de moléculas pequeñas de enzimas de la vía de glicosilación [véase, por ejemplo, Rothman et al. (1989) *Mol. Immunol.* 26 (12): 113-1123; Elbein (1991) *FASEB J.* 5: 3055; PCT/US2009/042610 y la patente de Estados Unidos No. 7.700.321]. La publicación PCT WO 03/035835 describe una variante de la línea celular CHO, las células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos enlazados a Asn(297), dando también como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped [véase también Shields, RL et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-2667]. La publicación PCT WO 99/54342 describe líneas celulares manipuladas para expresar glicosil transferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo, beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas genéticamente exhiben estructuras de GlcNac más bisectantes dando como resultado el aumento de actividad de ADCC de los anticuerpos [véase también Umana et al. (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176-180].

Alternativamente, los residuos de fucosa del anticuerpo pueden escindirse usando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina los residuos de fucosilo de los anticuerpos [Tarentino, A.L. et al. (1975) *Biochem.* 14: 5516-23].

Otra modificación de los anticuerpos que se contemplan en la presente invención es la pegilación. Un anticuerpo puede ser pegilado, por ejemplo, para aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unen al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferiblemente, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "polietilenglicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para formar derivados de otras proteínas, tales como monoalcoxi (C1-C10) o ariloxi-polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a ser pegilado es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para las proteínas de pegilación son conocidos en la técnica y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Véase, por ejemplo, los documentos EP 0154316 y EP 0401384.

En realizaciones adicionales, por ejemplo, en el uso de los anticuerpos de la divulgación con fines de diagnóstico o detección, los anticuerpos pueden comprender una etiqueta. Por "marcado" en la presente memoria se entiende que

un compuesto tiene al menos un elemento, isótopo o compuesto químico unido para permitir la detección del compuesto. En general, las etiquetas se dividen en tres clases: a) etiquetas isotópicas, que pueden ser isótopos radiactivos o pesados; b) magnéticas, eléctricas, térmicas; y c) tintes luminiscentes o coloreados; aunque las etiquetas incluyen también enzimas y partículas tales como partículas magnéticas. Las etiquetas preferidas incluyen, pero no se limitan a, complejos de lantánidos fluorescentes (incluyendo los de Europio y Terbio), y etiquetas fluorescentes incluyendo, pero no limitados a, puntos cuánticos, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde de malaquita, estilbeno, Amarillo Lucifer, Azul Cascada, Rojo Texas, los tintes Alexa, los tintes Cy, y otros descritos en la 6ª edición del Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland.

## 10 Enlazadores

La presente invención proporciona conjugados anticuerpo-compañero en los que el anticuerpo está unido al compañero a través de un enlazador químico. En algunos ejemplos, el enlazador es un enlazador peptídico, otros enlazadores incluyen hidracina y enlazadores de disulfuro. Además de los enlazadores que están unidos al compañero, la presente divulgación también proporciona brazos enlazadores escindibles que son apropiados para la unión a esencialmente cualquier especie molecular. El brazo enlazador puede ejemplificarse en la presente memoria por referencia a su unión a una fracción terapéutica. Sin embargo, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que los enlazadores pueden estar unidos a diversas especies incluyendo, pero sin limitarse a, agentes de diagnóstico, agentes analíticos, biomoléculas, agentes de direccionamiento, marcadores detectables y similares.

El uso de peptídico y otros enlazadores en conjugados de anticuerpo-compañero se describe en las solicitudes de patentes provisionales de los Estados Unidos Nos. 60/295.196; 60/295.259; 60/295.342; 60/304.908; 60/572.667; 60/661.174; 60/669.871; 60/720.499; 60/730.804; y 60/735.657 y las solicitudes de patente de los Estados Unidos Nos. 10/160.972; 10/161.234; 11/134.685; 11/134.826; y 11/398.854 y la patente de Estados Unidos No. 6.989.452 y la solicitud de patente PCT No. PCT/US2006/37793. En la patente de Estados Unidos No. 6.214.345, en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2003/0096743 y en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2003/0130189, de Groot et al., J. Med. Chem. 42, 5277 (1999); de Groot et al. J. Org. Chem. 43, 3093 (2000); de Groot et al., J. Med. Chem. Chem. 66, 8815, (2001); WO 02/083180; Carl et al., J. Med. Chem. Chem. Lett. 24, 479, (1981); Dubowchik et al., Bioorg & Med. Chem. Lett. 8, 3347 (1998); y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos No. 60/891.028.

En un ejemplo, la presente divulgación se refiere a enlazadores que son útiles para unir grupos de direccionamiento a agentes terapéuticos y marcadores. En otro ejemplo, esta divulgación proporciona enlazadores que imparten estabilidad a compuestos, reducen su toxicidad *in vivo*, o bien afectan favorablemente su farmacocinética, biodisponibilidad y/o farmacodinámica. Se prefiere generalmente que, en tales ejemplos, se escinda el enlazador, liberando el fármaco activo, una vez que el fármaco se suministra a su sitio de acción. Por lo tanto, en una realización, los enlazadores de la presente divulgación no son trazables, de modo que una vez eliminados del agente terapéutico o marcador (tal como durante la activación), no queda ningún rastro de la presencia del enlazador. En otra realización, los enlazadores se caracterizan por su capacidad para ser escindidos en un sitio en o cerca de la célula objetivo, tal como en el sitio de acción terapéutica o actividad del marcador. Tal escisión puede ser de naturaleza enzimática. Esta característica ayuda a reducir la activación sistémica del agente o marcador terapéutico, reduciendo la toxicidad y los efectos secundarios sistémicos. Los grupos escindibles preferidos para la escisión enzimática incluyen enlaces peptídicos, enlaces éster y enlaces disulfuro. En otras realizaciones, los enlazadores son sensibles al pH y se escinden a través de cambios en el pH.

Un aspecto de la presente divulgación es la capacidad de controlar la velocidad con la que se escinden los enlazadores. Con frecuencia se desea un enlazador que se escinda rápidamente. En algunas realizaciones, sin embargo, se puede preferir un enlazador que se escinda más lentamente. Por ejemplo, en una formulación de liberación sostenida o en una formulación con un componente de liberación rápida y de liberación lenta, puede ser útil proporcionar un enlazador que se escinda más lentamente. El documento WO 02/096910 proporciona varios complejos ligando-fármaco específicos que tienen un enlazador de hidracina. Sin embargo, no hay manera de "concertar" la composición del enlazador dependiendo de la velocidad de ciclación requerida, y los compuestos particulares descritos escinden el ligando del fármaco a una velocidad más lenta que la que se prefiere para muchos conjugados fármaco-enlazador. Por el contrario, los enlazadores de hidracina de la presente divulgación proporcionan una gama de velocidades de ciclación, desde muy rápida a muy lenta, permitiendo de este modo la selección de un enlazador particular de hidracina con base en la velocidad de ciclación deseada.

Por ejemplo, se puede conseguir una ciclación muy rápida con los enlazadores de hidracina que producen un único anillo de 5 miembros tras la escisión. Las velocidades de ciclación preferidas para la administración dirigida de un agente citotóxico a las células se consiguen usando enlazadores de hidracina que producen, tras la escisión, dos anillos de 5 miembros o un único anillo de 6 miembros resultante de un enlazador que tiene dos metilos en la posición geminal. Se ha demostrado que el efecto dimetilo geminal acelera la velocidad de la reacción de ciclación en comparación con un anillo único de 6 miembros sin los dos metilos en la posición geminal. Este es el resultado de la tensión que se alivia en el anillo. A veces, sin embargo, los sustituyentes pueden ralentizar la reacción en lugar de hacerla más rápida. A menudo, las razones del retraso se pueden atribuir a impedimentos estéricos. Por ejemplo, la sustitución de dimetilo geminal permite que ocurra una reacción de ciclación mucho más rápida en comparación con

cuando el carbono geminal es un CH<sub>2</sub>.

Es importante observar, sin embargo, que, en algunas realizaciones, se puede preferir un enlazador que se escinda más lentamente. Por ejemplo, en una formulación de liberación sostenida o en una formulación tanto con un componente de liberación rápida como de liberación lenta, puede ser útil proporcionar un enlazador que se escinda más lentamente. En ciertas realizaciones, se logra una velocidad lenta de ciclación usando un enlazador de hidracina que produce, tras la escisión, un sólo anillo de 6 miembros, sin la sustitución del dimetilo geminal o un sólo anillo de 7 miembros. Los enlazadores sirven también para estabilizar el agente terapéutico o marcador contra la degradación mientras está en circulación. Esta característica proporciona un beneficio significativo ya que dicha estabilización da como resultado prolongar la semivida de circulación del agente o marcador unido. El enlazador sirve también para atenuar la actividad del agente o marcador unido de modo que el conjugado es relativamente benigno mientras está en circulación y tiene el efecto deseado, por ejemplo, es tóxico, después de la activación en el sitio de acción deseado. Para los conjugados de agente terapéutico, esta característica del enlazador sirve para mejorar el índice terapéutico del agente.

Los grupos estabilizantes se seleccionan preferiblemente para limitar la eliminación y el metabolismo del agente o marcador terapéutico mediante enzimas que pueden estar presentes en la sangre o en el tejido no objetivo y se seleccionan además para limitar el transporte del agente o marcador en las células. Los grupos estabilizadores sirven para bloquear la degradación del agente o marcador y también pueden actuar proporcionando otras características físicas del agente o marcador. El grupo estabilizador también puede mejorar la estabilidad del agente o marcador durante el almacenamiento ya sea de una manera formulada o no formulada.

Idealmente, el grupo estabilizante es útil para estabilizar un agente terapéutico o marcador si sirve para proteger el agente o marcador de la degradación cuando se prueba mediante almacenamiento del agente o marcador en sangre humana a 37°C durante 2 horas y da como resultado menos del 20%, preferiblemente menos del 10%, más preferiblemente menos del 5% e incluso más preferiblemente menos del 2% de escisión del agente o marcador por las enzimas presentes en la sangre humana en las condiciones de ensayo dadas. La presente divulgación también se refiere a conjugados que contienen estos enlazadores. Más particularmente, la divulgación se refiere al uso de profármacos que pueden usarse para el tratamiento de enfermedades, especialmente para quimioterapia contra el cáncer. Específicamente, el uso de los enlazadores descritos en la presente memoria proporciona profármacos que muestran una alta especificidad de acción, una toxicidad reducida y una estabilidad mejorada en sangre con respecto a profármacos de estructura similar. Los enlazadores de la presente divulgación, tal como se describen aquí, pueden estar presentes en una variedad de posiciones dentro de la molécula asociada.

De este modo, se proporciona un enlazador que puede contener cualquiera de una variedad de grupos como parte de su cadena que se disociará in vivo, por ejemplo, en el torrente sanguíneo, a una velocidad que aumenta con respecto a la de las construcciones que carecen de tales grupos. También se proporcionan conjugados de los brazos del enlazador con agentes terapéuticos y de diagnóstico. Los enlazadores son útiles para formar análogos de profármacos de agentes terapéuticos y para enlazar reversiblemente un agente terapéutico o de diagnóstico a un agente de direccionamiento, un marcador detectable o un soporte sólido. Los enlazadores pueden incorporarse en complejos que incluyen citotoxinas.

La unión de un profármaco a un anticuerpo puede proporcionar ventajas adicionales de seguridad frente a conjugados de anticuerpos convencionales de fármacos citotóxicos. La activación de un profármaco puede conseguirse mediante una esterasa, tanto dentro de células tumorales como en varios tejidos normales, incluyendo plasma. Se ha demostrado que el nivel de actividad esterasa relevante en seres humanos es muy similar al observado en ratas y primates no humanos, aunque menor que el observado en ratones. La activación de un profármaco también puede conseguirse por escisión con glucuronidasa. Además del grupo peptídico, hidracina o disulfuro escindibles, se pueden introducir opcionalmente uno o más grupos enlazadores de autoinmolación entre la citotoxina y el agente de direccionamiento. Estos grupos enlazadores pueden describirse también como grupos espaciadores y contienen al menos dos grupos funcionales reactivos. Típicamente, se une una funcionalidad química del grupo espaciador a una funcionalidad química del agente terapéutico, por ejemplo, citotoxina, mientras que la otra funcionalidad química del grupo espaciador se utiliza para unirse a una funcionalidad química del agente de direccionamiento o del enlazador escindible. Ejemplos de funcionalidades químicas de grupos espaciadores incluyen grupos hidroxilo, mercapto, carbonilo, carboxilo, amino, cetona y mercapto.

Los enlazadores de autoinmolación son generalmente un alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido o un grupo heteroalquilo sustituido o no sustituido. En una realización, los grupos alquilo o arilo pueden comprender entre 1 y 20 átomos de carbono. También pueden comprender una fracción polietilenglicol.

Ejemplos de grupos espaciadores incluyen, por ejemplo, 6-aminohexanol, 6-mercaptohexanol, ácido 10-hidroxi-decanoico, glicina y otros aminoácidos, 1,6-hexanodiol, β-alanina, 2-aminoetanol, cisteamina (2-aminoetanol), ácido 5-aminopentanoico, ácido 6-aminohexanoico, ácido 3-maleimidobenzoico, ftalida, ftalidas sustituidas en α, el grupo carbonilo, ésteres animales, ácidos nucleicos, péptidos y similares.

El espaciador puede servir para introducir masa molecular y funcionalidad química adicionales en el complejo de

agente direccionador-citotoxina. Generalmente, la masa y la funcionalidad adicionales afectarán a la semivida en suero y a otras propiedades del complejo. De este modo, mediante la selección cuidadosa de grupos espaciadores, se pueden producir complejos de citotoxinas con una gama de semividas en suero.

Cuando están presentes espaciadores múltiples, se pueden usar espaciadores idénticos o diferentes.

- 5 Se puede usar una fracción enlazadora adicional que imparte preferiblemente mayor solubilidad o propiedades de agregación disminuidas a conjugados que utilizan un enlazador que contiene la fracción o que modifica la velocidad de hidrólisis del conjugado, tales enlazadores no tienen que ser de autoinmolación. En una realización, la fracción de enlazamiento es alquilo sustituido, alquilo no sustituido, arilo sustituido, arilo no sustituido, heteroalquilo sustituido o heteroalquilo no sustituido, cualquiera de los cuales puede ser lineal, ramificado o cíclico. Las sustituciones pueden ser, por ejemplo, un alquilo (C1-C6) inferior, alcoxi, alquiltio, alquilamino o dialquilamino. En ciertas realizaciones, los enlazadores comprenden una fracción no cíclica. En otra realización, los enlazadores comprenden cualquier polímero de aminoácidos cargado positivamente o negativamente, tal como polilisina o poliarginina. Los enlazadores pueden comprender un polímero tal como una fracción de polietilenglicol. Adicionalmente, el enlazador puede comprender, por ejemplo, tanto un componente polimérico como una fracción química pequeña. En una realización preferida, dichos enlazadores comprenden una fracción de polietilenglicol (PEG).

- La porción de PEG puede tener entre 1 y 50 unidades de longitud. Preferiblemente, el PEG tendrá 1-12 unidades repetidas, más preferiblemente 3-12 unidades repetidas, más preferiblemente 2-6 unidades repetidas, o aún más preferiblemente 3-5 unidades repetidas y lo más preferiblemente 4 unidades repetidas. Un enlazador puede consistir únicamente de la fracción PEG, o puede contener también un alquilo o heteroalquilo adicional sustituido o no sustituido. Es útil combinar PEG como parte de la fracción para aumentar la solubilidad en agua del complejo. Adicionalmente, la fracción de PEG reduce el grado de agregación que puede ocurrir durante la conjugación del fármaco al anticuerpo.

- Para una discusión adicional de los tipos de citotoxinas, enlazadores y otros métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase también la publicación PCT WO 2007/059404 de Gangwar et al. y titulada "Cytotoxic Compounds and Conjugates", Saito, G. et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 199-215; Trail, P.A. et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3: 207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2: 750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3: 1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53: 247-264.

#### Moléculas compañeras

- 30 La presente invención incluye un anticuerpo conjugado a una molécula compañera, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se denominan también aquí "inmunconjugados". Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o un agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, matarlas).

- 35 Ejemplos de moléculas compañeras de la presente invención incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracín-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos o homólogos de los mismos. Ejemplos de moléculas compañeras también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo dacarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antracilinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y agentes antimitóticos (por ejemplo vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos preferidos de moléculas compañeras que pueden conjugarse con un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de calicheamicina se encuentra disponible comercialmente (Mylotarg®, American Home Products).

- 50 Los ejemplos preferidos de moléculas asociadas son CC-1065 y las duocarmicinas. CC-1065 se aisló por primera vez de *Streptomyces zelensis* en 1981 por la compañía Upjohn (Hanka et al, *J. Antibiot*, 31: 1211 (1978), Martin et al., *J. Antibiot*, 33: 902 (1980), Martin et al *J. Antibiot* 34: 1119 (1981)) y se encontró que tenía una potente actividad antitumoral y antimicrobiana tanto in vitro como en animales de experimentación (Li et al., *Cancer Res.* 42: 999 (1982)). CC-1065 se une al ADN B bicatenario dentro del surco menor (Swenson et al., *Cancer Res.* 42: 2821 (1982)) con la preferencia de secuencias de 5'-d(A/GNTTA)-3' y 5'-d(AAAAA)-3' y alquila la posición N3 de la 3'-adenina mediante su unidad izquierda CPI presente en la molécula (Hurley et al., *Science* 226: 843 (1984)).

A pesar de su potente y amplia actividad antitumoral, CC-1065 no se puede usar en seres humanos porque provoca muerte retardada en animales de experimentación. Muchos análogos y derivados de CC-1065 y las duocarmicinas

son conocidos en la técnica. Se ha revisado la investigación sobre la estructura, síntesis y propiedades de muchos de los compuestos. Véase, por ejemplo, Boger et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 35: 1438 (1996); y Boger et al., *Chem. Rev.* 97: 787 (1997). Un grupo en Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd. ha preparado una serie de derivados de CC-1065. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.101.038; 5.641.780; 5.187.186; 5.070.092; 5.703.080; 5.070.092; 5.641.780; 5.101.038; y 5.084.468; y la solicitud PCT publicada, WO 96/10405 y la solicitud europea publicada O 537 575 A1. La Upjohn Company (Farmacia Upjohn) también ha estado activa en la preparación de derivados de CC-1065. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.739.350; 4.978.757, 5.332.837 y 4.912.227.

#### Propiedades físicas del anticuerpo

10 Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse además por las diversas propiedades físicas de los anticuerpos anti-BST1. Pueden usarse diversos ensayos para detectar y/o diferenciar diferentes clases de anticuerpos con base en estas propiedades físicas.

15 En algunas realizaciones, 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 dar como resultado una inmunogenicidad aumentada del anticuerpo o una alteración del pK del anticuerpo debido a la unión alterada del antígeno [Marshall et al. (1972) *Annu Rev Biochem* 41: 673-702; Gala FA y Morrison SL (2004) *J Immunol* 172: 5489-94; Wallick et al. (1988) *J Exp Med* 168: 1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12: 43R- 56R; Parekh et al. (1985) *Nature* 316: 452-7; Mimura et al. (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 se puede probar usando un ensayo de glicotransferencia, 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 se puede ensayar usando cromatografía de dispersión de luz Dionex (Dionex-LC), que escinde los sacáridos de un Fab en monosacáridos y analiza el contenido individual de sacárido. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-BST1 que no contenga glicosilación de 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.

25 En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención no contienen sitios de isomerismo de asparagina. Un efecto de desamidación o de ácido isoaspártico puede ocurrir en secuencias N-G o D-G, respectivamente. El efecto de desamidación o de ácido isoaspártico da como resultado la creación de ácido isoaspártico que disminuye la estabilidad de un anticuerpo creando una estructura retorcida fuera de un extremo terminal carboxi de cadena lateral en lugar de la cadena principal. La creación de ácido isoaspártico se puede medir usando un ensayo iso-cuantitativo, que usa una HPLC de fase inversa para probar el ácido isoaspártico.

30 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 típicamente cae dentro del intervalo de pH de 7-9,5 y el pI para un anticuerpo IgG4 típicamente cae dentro del intervalo de pH de 6-8. Los anticuerpos pueden tener un pI que está fuera de este rango. Aunque los efectos son generalmente desconocidos, se especula que los anticuerpos con un pI fuera del rango normal pueden tener algún despliegue e inestabilidad bajo condiciones *in vivo*. El punto isoeléctrico puede probarse usando un ensayo de enfoque isoeléctrico capilar, que crea un gradiente de pH y puede utilizar el enfoque láser para aumentar la precisión [Janini et al. (2002) *Electrophoresis* 23: 1605-11; Ma et al. (2001) *Chromatographia* 53: S75-89; Hunt et al. (1998) *J Chromatogr A* 800: 355-67]. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-BST1 que contiene un valor de pI que cae en el intervalo normal. Esto se puede conseguir seleccionando anticuerpos con un pI en el intervalo normal, o mediante la mutación de residuos de superficie cargados usando técnicas estándar bien conocidas en la técnica.

35 Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión que es indicativa de estabilidad térmica [Krishnamurthy R y Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3: 361-71]. Una estabilidad térmica más alta indica una mayor estabilidad global del anticuerpo *in vivo*. El punto de fusión de un anticuerpo se puede medir usando técnicas tales como calorimetría diferencial de barrido [Chen et al. (2003) *Pharm Res.* 20: 1952-60; Ghirlando et al. (1999) *Immunol Lett* 68: 47-52].  $T_{M1}$  indica la temperatura del desdoblamiento inicial del anticuerpo.  $T_{M2}$  indica la temperatura de desdoblamiento completo del anticuerpo. Generalmente, se prefiere que la  $T_{M1}$  de un anticuerpo de la presente invención sea mayor a 60°C, preferiblemente mayor a 65°C, incluso más preferiblemente mayor a 70°C. Alternativamente, la estabilidad térmica de un anticuerpo puede medirse usando difracción circular [Murray et al. (2002) *J. Chromatogr Sci* 40: 343-9].

40 En una realización preferida, se seleccionan anticuerpos que no se degradan rápidamente. La fragmentación de un anticuerpo anti-BST1 se puede medir 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].

45 En otra realización preferida, se seleccionan anticuerpos que tienen efectos de agregación mínimos. La agregación puede conducir al desencadenamiento de una respuesta inmune indeseada y/o propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. Generalmente, los anticuerpos son aceptables con una agregación de 25% o menos,

preferiblemente 20% o menos, aún más preferiblemente 15% o menos, incluso más preferiblemente 10% o menos e incluso más preferiblemente 5% o menos. La agregación puede medirse mediante varias técnicas bien conocidas en la técnica, incluyendo cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de columna de exclusión por tamaño (SEC) y dispersión de luz para identificar monómeros, dímeros, trímeros o multímeros.

## 5 Métodos de modificación de anticuerpos

Como se discutió anteriormente, los anticuerpos anti-BST1 que tienen secuencias de  $V_H$  y  $V_K$  descritas en la presente memoria pueden usarse para crear nuevos anticuerpos anti-BST1 modificando las secuencias de  $V_H$  y/o  $V_K$ , o la región o regiones constantes unidas a ellas. Por lo tanto, en otro ejemplo, las características estructurales de un anticuerpo anti-BST1 de la divulgación, por ejemplo, BST1\_A2, BST1\_A1 o BST1\_A3, se usan para crear anticuerpos anti-BST1 estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión al BST1 humano. Por ejemplo, una o más regiones CDR de BST1\_A2, BST1\_A1 o BST1\_A3, o mutaciones de las mismas, se pueden combinar de forma recombinante con regiones marco conocidas y/u otras CDR para crear anticuerpos anti-BST1 adicionales, modificados de forma recombinante de la divulgación, como se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de modificación es una o más de las secuencias de  $V_H$  y/o  $V_K$  proporcionadas en este documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo modificado por ingeniería genética, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias de  $V_H$  y/o  $V_K$  proporcionadas en este documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Por el contrario, la información contenida en la secuencia o secuencias se utiliza como el material de partida para crear una secuencia o secuencias de "segunda generación" derivadas de la secuencia o secuencias originales y luego se prepara la secuencia o secuencias de "segunda generación" y se expresan como una proteína.

Por consiguiente, en otro ejemplo, la divulgación proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-BST1 que comprende: proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de CDR1 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 10, 9 y 56, una secuencia de CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 12 o 51, 11 y 57, y/o una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 14, 13 y 58; 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 SEQ ID NOs: 16, 15 y 59, una secuencia de CDR2 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 18, 17 y 60 y/o una secuencia de CDR3 seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 20, 19 y 61, alterando al menos un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y expresando la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

Se pueden usar técnicas de biología molecular estándar para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada.

Preferiblemente, el anticuerpo codificado por la secuencia o secuencias de anticuerpo alteradas es uno que retiene una, algunas o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-BST1 descritos en la presente memoria, cuyas propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a: (a) unión al BST1 humano con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menos; (b) unión a células CHO humanas transfectadas con el BST1.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar usando ensayos estándar disponibles en la técnica y/o descritos en la presente memoria, tales como los expuestos en los Ejemplos (por ejemplo, citometría de flujo, ensayos de unión).

En ciertos ejemplos de los métodos de modificación de anticuerpos de la divulgación, las mutaciones pueden ser introducidas al azar o selectivamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-BST1 y los anticuerpos anti-BST1 modificados resultantes pueden ser seleccionados para determinar la actividad de unión y/u otras propiedades funcionales como se describe en la presente memoria. En la técnica se han descrito métodos mutacionales. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 describe métodos para crear y seleccionar mutaciones de anticuerpos usando mutagénesis de saturación, montaje de ligación sintético, o una combinación de los mismos. Alternativamente, la publicación PCT WO 03/074679 describe métodos de utilización de métodos de cribado computacional para optimizar las propiedades fisicoquímicas de anticuerpos.

## 50 Moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos de la invención

Otro aspecto de la invención se refiere a 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 una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisló" o "se hizo sustancialmente puro" cuando se purificó lejos de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, mediante técnicas estándar, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en la técnica. Véase F. Ausubel, et al., Ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing y Wiley Interscience, N. Y. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede o no contener secuencias intrónicas. En una realización

preferida, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse usando técnicas de biología molecular convencionales. Para anticuerpos expresados por hibridomas, los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo producido por el hibridoma pueden obtenerse mediante técnicas de amplificación por PCR estándar o de clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos de una biblioteca de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, usando técnicas de despliegue en fagos), los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo pueden recuperarse de la biblioteca.

Las moléculas preferidas de ácidos nucleicos de la divulgación son las que codifican las secuencias de  $V_H$  y  $V_K$  de los anticuerpos monoclonales BST1\_A2, BST1\_A1 o BST1\_A3. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de  $V_H$  de BST1\_A2, BST1\_A1 o BST1\_A3 se muestran en las SEQ ID NO: 6, 5 y 54, respectivamente. Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de  $V_K$  de BST1\_A2, BST1\_A1 o BST1\_A3 se muestran en las SEQ ID NOs: 8, 7 y 55, respectivamente.

Otros ácidos nucleicos preferidos de la divulgación son 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 SEQ ID NOs: 6, 5, 8, 7, 54 y 55, cuyos ácidos nucleicos codifican un anticuerpo de la invención, o una porción de unión al antígeno del mismo.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácido nucleico es el número de posiciones en la secuencia en la que el nucleótido es idéntico, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para una alineación óptima de dos secuencias. La comparación de las 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.

Aún más, los ácidos nucleicos preferidos de la divulgación comprenden una o más porciones que codifican CDR de las secuencias de ácido nucleico mostradas en las SEQ ID NOs: 6, 5, 8, 7, 54 y 55. En este ejemplo, el ácido nucleico puede codificar la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de cadena pesada y ligera de BST1\_A2, BST1\_A1 o BST1\_A3.

Los ácidos nucleicos que tienen al menos el 80%, como al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98% o al menos el 99% de identidad de secuencia, con dicha porción codificante de CDR de las SEQ ID NOs: 6, 5, 8, 7, 54 y 55 (secuencias de  $V_H$  y  $V_H$ ) son también ácidos nucleicos preferidos de la divulgación. Dichos ácidos nucleicos pueden diferir de la porción correspondiente de las SEQ ID NOs: 6, 5, 8, 7, 54 y 55 en una región codificante no de CDR y/o en una región codificadora de CDR. Cuando la diferencia está en una región codificadora de CDR, la región CDR de ácido nucleico codificada por el ácido nucleico comprende típicamente una o más modificaciones de secuencia conservadoras como se definen aquí en comparación con la secuencia de CDR correspondiente de BST1\_A2, BST1\_A1 o BST1\_A3.

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN que codifican los segmentos de  $V_H$  y  $V_K$ , estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas estándar de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes del fragmento Fab, o en un scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica  $V_K$  o  $V_H$  está operativamente unido a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término "operativamente enlazado", tal como se utiliza en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN están unidos de tal 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 cadena pesada de longitud completa uniendo operativamente el ADN que codifica  $V_H$  a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ ). Las secuencias de los genes de la región constante de cadena pesada murina son conocidas en la técnica [véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, publicación NIH No. 91-3242] y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse por amplificación PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero lo más preferiblemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica  $V_H$  puede estar operativamente unido a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante de  $C_{H1}$  de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región  $V_L/V_K$  puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab) mediante la unión operativa del ADN que codifica  $V_L$  a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera,  $C_L$ . Las secuencias de genes de la región constante de cadena ligera de murino son conocidas en la técnica [véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, publicación NIH No. 91-3242] y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse por amplificación PCR estándar. En realizaciones preferidas, la región constante de cadena ligera puede ser una región constante

kappa o lambda.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN que codifican  $V_H$  y  $V_L/V_K$  están operativamente unidos a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos  $(Gly4-Ser)_3$ , de manera que las secuencias de  $V_H$  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 enlazador flexible [véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; McCafferty et al., (1990) *Nature* 348: 552-554].

#### Producción de anticuerpos monoclonales

De acuerdo con la invención, el BST1 o un fragmento o derivado del mismo puede usarse como un inmunógeno para generar anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a dicho inmunógeno. Dichos inmunógenos pueden aislarse por cualquier medio conveniente. Un experto en la técnica reconocerá que están disponibles muchos procedimientos para la producción de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y. Un experto en la técnica apreciará también que fragmentos de unión o fragmentos Fab que imitan anticuerpos también se pueden preparar a partir de información genética mediante diversos procedimientos [*Antibody Engineering: A Practical Approach* (Borrebäck, C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; *J. Immunol.* 149, 3914-3920 (1992)].

En un ejemplo, se producen anticuerpos para un dominio específico del BST1. En un ejemplo específico, se usan fragmentos hidrofílicos de BST1 como inmunógenos para la producción de anticuerpos.

En la producción de anticuerpos, el cribado para el anticuerpo deseado puede realizarse mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima). Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconocen un dominio específico del BST1, se pueden ensayar hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento de BST1 que contiene tal dominio. Para la selección de un anticuerpo que se une específicamente a un primer homólogo de BST1, pero que no se une específicamente a (o se une menos ávidamente a) un segundo homólogo de BST1, se puede seleccionar con base en la unión positiva al primer homólogo de BST1 y la falta de unión a (o unión reducida a) el segundo homólogo de BST1. De manera similar, para la selección de un anticuerpo que se une específicamente al BST1 pero que no se une específicamente a (o se une menos ávidamente a) una isoforma diferente de la misma proteína (tal como una glicofoma diferente que tiene el mismo péptido central que el BST1), se puede seleccionar sobre la base de la unión positiva al BST1 y la falta de unión a (o unión reducida a) la isoforma diferente (por ejemplo, una glicofoma diferente). Por tanto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo (tal como un anticuerpo monoclonal) que se une con mayor afinidad (por ejemplo, al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, en particular al menos 10 veces mayor afinidad) al BST1 que a una isoforma o isoformas diferentes (por ejemplo, glicofomas) del BST1.

Los anticuerpos policlonales que pueden usarse en los métodos de la divulgación son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas del suero de animales inmunizados. También se puede usar suero inmune no fraccionado. Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales con el BST1, un fragmento del BST1, un polipéptido relacionado con BST1, o un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1. Por ejemplo, una forma es purificar polipéptidos de interés o sintetizar los polipéptidos de interés usando, por ejemplo, métodos de síntesis de péptidos en fase sólida bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Guide to Protein Purification*, Murray P. Deutcher, ed., *Meth. Enzymol.* Vol 182 (1990); *Solid Phase Peptide Synthesis*, Greg B. Fields ed., *Meth. Enzymol.* Vol 289 (1997); Kiso et al., *Chem. Pharm. Bull. (Tokio)* 38: 1192-99, 1990; Mostafavi et al., *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids* 1: 255-60, 1995; Fujiwara et al., *Chem. Pharm. Bull. (Tokio)* 44: 1326-31, 1996. Los polipéptidos seleccionados pueden utilizarse entonces para inmunizar mediante la inyección de diversos animales hospederos, incluyendo, pero sin limitarse a conejos, ratones, ratas, etc., para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. Pueden usarse diversos adyuvantes (es decir, inmunostimulantes) para mejorar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, incluyendo, pero sin limitarse a, adyuvante de Freund completo o incompleto, un gel mineral tal como hidróxido de aluminio, sustancia tensoactiva tal como lisolecitina, poliál plurónico, un polianión, un péptido, una emulsión de aceite, hemocianina de lapa ojo de cerradura, dinitrofenol y un adyuvante tal como BCG (bacilo Calmette-Guerin) o *corinebacterium parvum*. Los adyuvantes adicionales son también bien conocidos en la técnica.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos hacia el BST1, puede usarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Por ejemplo, la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256: 495-497), así como la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas [Kozbor et al. (1983) *Immunology Today* 4:72], y la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos [Cole et al. (1985) en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96]. Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce los anticuerpos monoclonales puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. En una realización adicional de la invención, se pueden producir anticuerpos monoclonales en animales libres de gérmenes utilizando tecnología conocida (PCT/US90/02545).

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón

es un procedimiento muy bien establecido. En la técnica se conocen protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión. También se conocen compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

5 Los anticuerpos monoclonales incluyen, pero no se limitan a anticuerpos monoclonales humanos y anticuerpos monoclonales quiméricos (por ejemplo, quimeras de humano-ratón).

10 Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente invención se pueden preparar basándose en la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado como se ha descrito anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera puede obtenerse a partir del hibridoma no humano de interés y modificarse por ingeniería genética para contener secuencias de inmunoglobulina no murina (por ejemplo, humana) usando técnicas de biología molecular convencionales. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden estar enlazadas a regiones constantes humanas usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.816.567 de Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, se pueden insertar regiones CDR murinas en un marco humano usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.225.539 de Winter y las patentes de Estados Unidos Nos. 5.530.101, 5.585.089, 5.693.762 y 6.180.370 de Queen et al.).

15 Se pueden producir anticuerpos completamente humanos utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que son incapaces de expresar genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes de cadena ligera y pesada humana. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, la totalidad o una parte del BST1. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de células B, y posteriormente sufren cambio de clase y mutación somática. De este modo, utilizando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones de las cepas HuMAb Mouse® (Medarex®, Inc.) y KM Mouse®. La cepa HuMAb Mouse® (Medarex®, Inc.) se describe en Lonberg y Huszar (1995, Int. Rev. Immunol., 13: 65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.625.126; la patente de Estados Unidos No. 5.633.425; la patente de Estados Unidos No. 5.569.825; la patente de Estados Unidos No. 5.661.016; y la patente de Estados Unidos No. 5.545.806. La cepa KM mouse® se refiere a un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana y se describe en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 de Ishida et al.

20 Todavía más, los sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden usarse para elevar anticuerpos anti-BST1 de la invención. Por ejemplo, se puede usar un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Amgen, Inc.); tales ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 de Kucherlapati et al.

25 Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo [Jespers et al. (1994) Biotechnology 12: 899-903].

30 Además, están disponibles en la técnica sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para elevar anticuerpos anti-BST1. Por ejemplo, pueden usarse ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana, denominados "ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas que portan transcromosomas de cadena pesada y ligera humana [Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20: 889-894] y la publicación PCT No. WO2002/092812 y se puede usar para aumentar los anticuerpos anti-BST1.

35 Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden prepararse también utilizando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunes humanas de tal manera que se puede generar una respuesta de anticuerpo humano tras la inmunización. Tales ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.476.994 y 3.698.767.

40 Los anticuerpos de la presente invención pueden generarse mediante el uso de la tecnología de despliegue en fagos para producir y cribar bibliotecas de polipéptidos para la unión a un objetivo seleccionado [véase, por ejemplo, Cwirla et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-82, 1990; Devlin et al., Science 249, 404-6, 1990; Scott y Smith, Science 249, 386-88, 1990; y Ladner et al., patente de Estados Unidos No. 5.571.698]. Un concepto básico de los métodos de despliegue en fagos es el establecimiento de una asociación física entre el ADN que codifica un polipéptido que va a ser cribado y el polipéptido. Esta asociación física es proporcionada por la partícula de fago, que muestra un polipéptido como parte de una cápside que encierra el genoma del fago que codifica el polipéptido. El establecimiento de una asociación física entre polipéptidos y su material genético permite el cribado masivo

simultáneo de un número muy grande de fagos que portan diferentes polipéptidos. Los fagos que muestran un polipéptido con afinidad por una unión objetivo con el objetivo y estos fagos se enriquecen por cribado de afinidad con el objetivo. La identidad de los polipéptidos desplegados a partir de estos fagos puede determinarse a partir de sus respectivos genomas. Usando estos métodos, un polipéptido identificado por tener una afinidad de unión por un objetivo deseado puede ser sintetizado a granel por medios convencionales. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6.057.098. En particular, tales fagos pueden utilizarse para mostrar dominios de unión al antígenos expresados a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humana o murina). El fago que expresa un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés puede seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. Los fagos utilizados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen fd y dominios de unión a M13 expresados a partir de fagos con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizados con disulfuro fusionados de forma recombinante con el gen del fago III o con la proteína del gen VIII. Los métodos de despliegue en fagos que se pueden usar para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman et al. (1995) *J. Immunol. Methods* 182: 41-50; Ames et al. (1995) *J. Immunol. Methods* 184: 177-186; Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958 (1994); Persic et al. (1997) *Gene* 187 9-18; Burton et al. (1994) *Advances in Immunology* 57: 191-280; Solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y patentes de Estados Unidos Nos. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Tal como se describe en las referencias anteriores, después de la selección del fago, las regiones codificantes del anticuerpo del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y expresado en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células de plantas, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, también se pueden emplear técnicas para producir de manera recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> utilizando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al. (1992) *BioTechniques* 12 (6): 864-869; y Sawai et al. (1995) *AJRI* 34: 26-34; y Better et al. (1988) *Science* 240: 1041-1043.

Ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fv de cadena única y anticuerpos incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos Nos. 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al. (1991), *Methods in Enzymology* 203: 46-88; Shu et al. (1993) *PNAS* 90: 7995-7999; y Skerra et al. (1988) *Science* 240: 1038-1040.

La invención proporciona fragmentos funcionalmente activos, derivados o análogos de las moléculas de inmunoglobulina anti-BST1. Funcionalmente activo significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de provocar anticuerpos anti-anti-idiotipo (es decir, anticuerpos terciarios) que reconocen el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo del que deriva el fragmento, derivado o análogo. Específicamente, en una realización particular, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina puede mejorarse por supresión de las secuencias de marco y de CDR que son C-terminales a la secuencia de CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de CDR se unen al antígeno, se pueden usar péptidos sintéticos que contienen las secuencias de CDR en ensayos de unión con el antígeno por cualquier método de ensayo de unión conocido en la técnica.

La presente invención proporciona fragmentos de anticuerpos tales como, pero sin limitarse a, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y fragmentos Fab. Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos pueden ser generados por técnicas conocidas. Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> consisten en la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio C<sub>H</sub>1 de la cadena pesada y se generan por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo. Los fragmentos Fab se generan reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. La invención también proporciona dímeros de cadena pesada y de cadena ligera de los anticuerpos de la invención, o cualquier fragmento mínimo de los mismos tales como Fv o anticuerpos de cadena sencilla (SCA) [por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos No. 4.946.778; Bird, (1988) *Science* 242: 423-42; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; y Ward et al. (1989) *Nature* 334: 544-5], o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo de la invención. Los anticuerpos de cadena única se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de cadena única. Pueden utilizarse técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* [Skerra et al. (1988) *Science* 242: 1038-1041].

En otros ejemplos, la divulgación proporciona proteínas de fusión de las inmunoglobulinas de la invención (o fragmentos funcionalmente activos de las mismas), por ejemplo, en las que la inmunoglobulina se fusiona a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico) ya sea en el terminal N o el terminal C a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción de la misma, preferiblemente al menos una porción de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no es la inmunoglobulina. Preferiblemente, la inmunoglobulina, o fragmento de la misma, está unida covalentemente a la otra proteína en el extremo terminal N del dominio constante. Como se ha indicado anteriormente, tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación, aumentar la semivida *in vivo* y potenciar el suministro de un antígeno a través de una barrera epitelial al sistema inmune.

Las inmunoglobulinas de la invención incluyen análogos y derivados que se modifican, es decir, mediante la unión

covalente de cualquier tipo de molécula, siempre y cuando dicha unión covalente no perjudique la unión inmunespecífica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y análogos de las inmunoglobulinas incluyen aquellos que han sido modificados adicionalmente, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación, formación de derivados por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitada a escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Además, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

#### Inmunización de ratones

Los ratones pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida del antígeno BST1 y/o BST1 recombinante, o células que expresan BST1. Preferiblemente, los ratones tendrán de 6 a 16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, se puede usar una preparación purificada o recombinante (100 µg) del antígeno BST1 para inmunizar los ratones por vía intraperitoneal.

La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones responden cuando se inmunizan intraperitonealmente (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund. Sin embargo, también se ha encontrado que los adyuvantes distintos de Freund son eficaces. Además, se encuentra que las células enteras en ausencia de adyuvante son altamente inmunogénicas. La respuesta inmunitaria puede monitorearse a lo largo del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen por hemorragias retroorbitales. El plasma puede ser cribado por ELISA (como se describe a continuación) para ensayar títulos satisfactorios. Los ratones pueden ser reforzados por vía intravenosa con antígeno en 3 días consecutivos, teniendo lugar el sacrificio y remoción del bazo 5 días después. En una realización, pueden usarse cepas de ratón A/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me.).

#### Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la invención se pueden producir en un transfectoma de célula huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como es bien conocido en la técnica [por ejemplo, Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202].

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, se pueden obtener ADN que codifican cadenas ligera y pesada parciales o completas, mediante técnicas de biología molecular convencionales (por ejemplo, amplificación por PCR o clonación de ADNc usando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los ADN pueden insertarse en vectores de expresión de manera que los genes estén operativamente enlazados a secuencias de control transcripcional y de traducción. En este contexto, el término "operativamente enlazado" pretende significar que un gen de anticuerpo se liga en un vector de tal manera que las secuencias de control transcripcional y de traducción dentro del vector sirvan a su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de expresión se eligen para ser compatibles con la célula huésped de expresión utilizada.

La célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores idénticos seleccionables que permiten una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, se puede usar un único vector que codifica tanto polipéptidos de cadena pesada como de cadena ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica [Proudfoot (1986) *Nature* 322: 52; Kohler (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2197]. Las secuencias de codificación para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligación de sitios de restricción complementarios sobre el fragmento del gen de anticuerpo y el vector, o ligación del extremo romo si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden usarse para crear genes de anticuerpo de longitud completa de cualquier isotipo de anticuerpo insertándolos en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena pesada del isotipo deseado de modo que el segmento de  $V_H$  está operativamente unido al segmento o segmentos de  $C_H$  en el vector y el segmento de  $V_K$  está unido operativamente al segmento  $C_L$  dentro del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo a partir de una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo puede clonarse en el vector de tal manera que el péptido señal esté unido en el marco al extremo terminal amino 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 que no es inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la invención portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, 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, pueden 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 de células hospedadoras de mamíferos incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV), virus del simio 40 (SV40), adenovirus (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y polio. Alternativamente, pueden usarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de la ubiquitina o el promotor de la  $\beta$ -globina. Además, los elementos reguladores compuestos por secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SR $\alpha$ , que contiene secuencias del promotor temprano de SV40 y la repetición terminal larga del virus de leucemia de células T humanas tipo 1 [Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Celda. Biol. 8: 466-472].

Además de los genes de cadena del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la invención pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, sobre una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped de dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para la selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan 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 de ADN exógeno en una célula huésped procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos de la invención en células huésped procariontas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferiblemente células huésped de mamífero, es la más preferida debido a que tales células eucariotas, y en particular células de mamífero, son más probables que las células procariontas para ensamblar y secretar un anticuerpo debidamente plegado e inmunológicamente activo. Se ha informado que la expresión procarionta 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 preferidas de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor de genes tempranos intermedios principales de citomegalovirus humano [Foecking et al., 1986, Gene 45: 101; Cockett et al. (1990) BioTechnology 8: 2], células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159: 601-611), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. En particular, para su uso con células de mieloma NSO, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión génica GS descrito en los documentos WO 87/04462 (de Wilson), WO 89/01036 (de Bebbington) y EP 338.841 (de Bebbington).

Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión del huésped para expresar una molécula de anticuerpo de la invención. Tales sistemas de expresión del huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de interés pueden producirse y purificarse posteriormente, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes apropiadas de nucleótidos, expresar la molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vectores de expresión de ADN de cósmido que contienen secuencias codificadoras de anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificadoras de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias codificantes del anticuerpo; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de coliflor, CaMV, virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan constructos de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5 K del virus vacuna).

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo del uso destinado para la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que son fácilmente purificados. Tales vectores incluyen, pero no se limitan, al vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., (1983) EMBO J. 2: 1791), en el que la secuencia codificante del anticuerpo puede ligarse

individualmente en el vector en marco con la región de codificación *lac Z* de manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN [Inouye & Inouye (1985) *Nucleic Acids Res.* 13: 3101-3109; Van Heeke y Schuster (1989) *J. Biol. Chem.* 24: 5503-5509]; y los vectores pGEX similares pueden usarse también para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de proteasa de trombina o el factor Xa de manera que el producto de gen objetivo clonado pueda liberarse de la fracción GST.

En un sistema de insectos, el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se usa como un vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de poliedrina) del virus y se pone bajo control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de poliedrina). En células huésped de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus (por ejemplo, un sistema de expresión de adenovirus).

Como se ha discutido anteriormente, se puede escoger una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la manera específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína.

Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de anticuerpos recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden producir líneas celulares que expresan de forma estable un anticuerpo de interés transfectando las células con un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos del anticuerpo y la secuencia de nucleótidos de una seleccionable (por ejemplo, neomicina o higromicina) y seleccionando la expresión del marcador seleccionable. Tales líneas celulares manipuladas pueden ser particularmente útiles en el cribado y evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Los niveles de expresión de la molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante amplificación del vector [para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987)]. Cuando un marcador en el sistema vectorial que expresa el anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará [Crouse et al., 1983, *Mol. Celda. Biol.* 3: 257].

Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo en 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, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se hacen crecer las células huésped. Una vez que la molécula de anticuerpo de la invención se ha expresado de forma recombinante, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de anticuerpo, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad tal como con proteína A o antígeno específico y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

Alternativamente, cualquier proteína de fusión puede purificarse fácilmente utilizando un anticuerpo específico para la proteína de fusión que se expresa. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht et al. permite la purificación fácil de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas [Janknecht et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8972-8977]. En este sistema, el gen de interés se subclona en un plásmido de recombinación de vacuna de tal manera que el marco de lectura abierto del gen se fusiona de forma traduccional a una etiqueta amino-terminal que consiste en seis residuos de histidina. La etiqueta sirve como un dominio de unión a la matriz para la proteína de fusión. Los extractos de células infectadas con el virus vacuna recombinante se cargan en columnas de ácido nitriloacético  $Ni^{2+}$  - agarosa y las proteínas marcadas con histidina se eluyen selectivamente con reguladores que contienen imidazol.

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

Los anticuerpos que se generan por estos métodos pueden seleccionarse entonces cribando primero afinidad y especificidad con el polipéptido purificado de interés y, si es necesario, comparando los resultados con la afinidad y especificidad de los anticuerpos con polipéptidos que se desea sean excluidos de la unión. Los anticuerpos se pueden ensayar por la unión al BST1 mediante, por ejemplo, ELISA estándar. El procedimiento de cribado puede implicar la inmovilización de los polipéptidos purificados en pozos separados de placas de microtitulación. La solución que contiene un anticuerpo potencial o grupos de anticuerpos se coloca a continuación en los respectivos pozos de microtitulación y se incuba durante aproximadamente 30 minutos a 2 h. Los pozos de microtitulación se lavan a continuación y se añade a los pozos un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, un anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina si los anticuerpos elevados son anticuerpos de ratón) y se incuba durante

aproximadamente 30 minutos y después se lava. Se añade sustrato a los pozos y aparecerá una reacción de color en la que está presente el anticuerpo contra el polipéptido o los polipéptidos inmovilizados.

Los anticuerpos así identificados pueden analizarse posteriormente en cuanto a afinidad y especificidad en el diseño de ensayo seleccionado. En el desarrollo de inmunoensayos para una proteína objetivo, la proteína objetivo purificada actúa como un patrón con el que juzgar la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo usando los anticuerpos que se han seleccionado. Debido a que la afinidad de unión de diversos anticuerpos puede diferir, ciertos pares de anticuerpos (por ejemplo, en ensayos tipo sándwich) pueden interferir entre sí de forma estérica, etc., el rendimiento de ensayo de un anticuerpo puede ser una medida más importante que la afinidad absoluta y la especificidad de un anticuerpo.

- 5 Los expertos en la técnica reconocerán que pueden adoptarse muchos enfoques en la producción de anticuerpos o fragmentos de unión y cribado y selección por afinidad y especificidad para los diversos polipéptidos, pero estos enfoques no cambian el alcance de la invención.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-BST1 seleccionados se unen a epítopos únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, IL). Los estudios de competición utilizando anticuerpos monoclonales no marcados y anticuerpos monoclonales biotinilados se pueden realizar usando las placas de ELISA recubiertas con BST1. La unión de mAb biotinilado puede detectarse con una sonda de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

- 15 Para determinar el isotipo de anticuerpos purificados, se pueden realizar ELISA de isotipos usando reactivos específicos para anticuerpos de un isotipo particular.

Los anticuerpos anti-BST1 se pueden ensayar adicionalmente con respecto a la reactividad con el antígeno BST1 mediante transferencia Western. Brevemente, se puede preparar BST1 y someterlo a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ternera fetal al 10% y se sondan con los anticuerpos monoclonales a ensayar.

- 20 La especificidad de unión de un anticuerpo de la invención también se puede determinar monitoreando la unión del anticuerpo a células que expresan BST1, por ejemplo, mediante citometría de flujo. Típicamente, una línea celular, tal como una línea celular CHO, puede transfectarse con un vector de expresión que codifica BST1. La proteína transfectada puede comprender una etiqueta, tal como una etiqueta myc, preferiblemente en el extremo terminal N, para la detección usando un anticuerpo para la etiqueta. La unión de un anticuerpo de la invención a BST1 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 por BST1 puede estudiarse adicionalmente determinando si el anticuerpo se une o no a otras proteínas, tal como otro miembro de la familia Eph usando los mismos métodos mediante los cuales se determina la unión a BST1.

### 35 Inmunoconjugados

En otro aspecto, la presente invención presenta un anticuerpo anti-BST1, o un fragmento del mismo, conjugado con una fracción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados se denominan en la presente memoria como "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o un agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células (por ejemplo, matarlas). Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracín-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU) ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo vincristina y vinblastina).

- 40
- 45
- 50

Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con un anticuerpo de la invención incluyen duocarmicinas, calicheamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de calicheamicina está disponible comercialmente (Mylotarg®, American Home Products).

Las citotoxinas pueden conjugarse con anticuerpos de la invención utilizando la tecnología de enlazador disponible en la técnica. Ejemplos de tipos de enlazadores que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores que contienen péptidos. Se puede elegir un enlazador que sea, por ejemplo, susceptible de escisión por un pH bajo dentro del compartimento

- 55

lisosómico o susceptible de escisión por proteasas, tales como proteasas preferiblemente expresadas en tejido tumoral tal como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).

Ejemplos de citotoxinas se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 6.989.452, 7.087.600 y 7.129.261 y en las solicitudes PCT Nos. PCT/US2002/17210, PCT/US2005/017804, PCT/US2006/37793, PCT/US2006/060050, PCT/US2006/060711, WO2006/110476, y en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 60/891.028. Para más información sobre los tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase también Saito, G. et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55: 199-215; Trail, P.A. et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3: 207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2: 750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3: 1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 53: 247-264.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden conjugarse con un isótopo radiactivo para generar radiofármacos citotóxicos, también denominados radioinmunoconjugados. Ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo 131, indio 111, itrio 90 y lutecio 177. Un método para preparar radioinmunoconjugados se establece en la técnica. Ejemplos de radioinmunoconjugados están disponibles comercialmente, incluyendo Zevalin® (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals), y métodos similares pueden usarse para preparar radioinmunoconjugados usando los anticuerpos de la invención.

Los conjugados de anticuerpo de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y la fracción de fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como el 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 estimulador de colonias de macrófagos granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar tal fracción terapéutica con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), páginas 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (2a Ed.), Robinson et al. (eds.), páginas 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), páginas 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), páginas 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

### 35 Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente invención presenta moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-BST1, o un fragmento del mismo, de la invención. Un anticuerpo de la invención, o porciones de unión al antígeno del mismo, pueden formar derivados o enlazarse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se une a al menos dos sitios de unión diferentes o moléculas objetivo. De hecho, el anticuerpo de la invención puede formar un derivado 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 también están destinadas a estar abarcadas por el término "molécula biespecífica" tal como se usa en la presente memoria. Para crear una molécula biespecífica de la invención, un anticuerpo de la invención puede estar funcionalmente unido (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro tipo) a una o más moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de unión, de modo que se produce una molécula biespecífica.

Por consiguiente, la presente invención incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para un primer epítipo objetivo (es decir, BST1) y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo objetivo. El segundo epítipo objetivo puede estar presente en la misma proteína objetivo que la unida por la primera especificidad de unión; o el segundo epítipo objetivo puede estar presente de una proteína objetivo diferente a la unida por la primera proteína a la que está unida por la primera especificidad de unión. El segundo epítipo objetivo puede estar presente en la misma célula que el primer epítipo objetivo (es decir, BST1); o el segundo epítipo objetivo puede estar presente en un objetivo que no es mostrado por la célula que muestra el primer epítipo objetivo. Como se usa en la presente memoria, el término "especificidad de unión" se refiere a una fracción que comprende al menos un dominio variable de anticuerpo.

En una realización de la invención, el segundo epítipo objetivo es un receptor Fc, por ejemplo, Fc $\gamma$ RI humano (CD64) o un receptor Fc $\alpha$  humano (CD89). Por lo tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas capaces de unirse tanto a células efectoras que expresan Fc $\gamma$ R o Fc $\alpha$ R (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células

polimorfonucleares (PMN), como a células objetivo que expresan BST1. Estas moléculas biespecíficas dirigen células que expresan BST1 a células efectoras y provocan las actividades de células efectoras mediadas por el receptor Fc, tales como fagocitosis de células que expresan BST1, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), liberación de citoquinas o generación de anión superóxido.

5 En otra realización de la invención, el segundo epítipo objetivo es CD3 o CD5. Por lo tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas capaces de unirse tanto a células efectoras que expresan CD3 o CD5 (por ejemplo, células T citotóxicas que expresan CD3 o CD5), como a células objetivo que expresan BST1. Estas moléculas biespecíficas dirigen células que expresan BST1 a células efectoras y desencadenan actividades de células efectoras mediadas por CD3 o CD5, tales como la expansión clonal de células T y la citotoxicidad de células T. En esta realización, el anticuerpo biespecífico de la invención puede tener un total de dos o tres dominios variables de anticuerpo, en donde la primera porción del anticuerpo biespecífico es capaz de reclutar la actividad de una célula efectora inmune humana mediante unión específicamente a un antígeno efector localizado en la célula efectora inmune humana, en la que el antígeno efector es el antígeno CD3 o CD5 humano, consistiendo dicha primera porción de un dominio variable de anticuerpo y una segunda porción del anticuerpo biespecífico es capaz de unirse específicamente a un antígeno objetivo distinto del antígeno efector, por ejemplo, BST1, estando dicho antígeno objetivo situado en una célula objetivo distinta de dicha célula efectora inmune humana, y dicha segunda porción comprendiendo uno o dos dominios variables de anticuerpo.

En una realización 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 o una especificidad de unión a CD3 o CD5 y una especificidad de unión a anti-BST1. En una realización, la tercera especificidad de unión es una porción de factor anti-mejoramiento (EF), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y por lo tanto aumenta la respuesta inmune contra la célula objetivo. La "porción del factor anti-mejoramiento" puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor y, por lo tanto, da como resultado un mejoramiento del efecto de los determinantes de unión para el receptor Fc o el antígeno celular objetivo. La "porción del factor anti-mejoramiento" puede unirse a un receptor Fc o un antígeno celular objetivo. Alternativamente, la porción del factor anti-mejoramiento puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen la primera y segunda especificidades de unión. Por ejemplo, la parte del factor anti-mejoramiento puede unirse a una célula T citotóxica (por ejemplo, a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmunitaria que da como resultado una mayor respuesta inmune contra la célula objetivo).

En una realización, las moléculas biespecíficas de la invención comprenden como especificidad de unión al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que incluye, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fd, dAb o un Fv de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o de cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o un constructo de cadena sencilla como se describe en la patente de Estados Unidos No. 4.946.778.

En una realización, la especificidad de unión por un receptor Fc $\gamma$  se proporciona mediante un anticuerpo monoclonal, cuya unión no está bloqueada por la inmunoglobulina G (IgG) humana. Como se usa aquí, 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 Fc $\gamma$ : Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) y Fc $\gamma$ RIII (CD16). En una realización preferida, el receptor Fc $\gamma$  es un Fc $\gamma$ RI humano de alta afinidad. El Fc $\gamma$ RI humano es una molécula de 72 kDa, que muestra alta afinidad por la IgG monomérica ( $10^8$  -  $10^9$  M<sup>-1</sup>).

La producción y caracterización de ciertos anticuerpos monoclonales anti-Fc $\gamma$  preferidos se describen en la publicación PCT WO 88/00052 y en la patente de Estados Unidos No. 4.954.617. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII o Fc $\gamma$ RIII en un sitio que es distinto del sitio de unión de Fc $\gamma$  del receptor y, por lo tanto, su unión no está bloqueada sustancialmente por los niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos anti-Fc $\gamma$ RI específicos útiles en esta invención son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. El hibridoma productor de mAb 32 está disponible en la American Type Culture Collection, ATCC acceso No. HB9469. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-receptor Fc $\gamma$  es una forma humanizada de anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 y la publicación PCT WO 94/10332. La línea celular productora de anticuerpo H22 se depositó en la American Type Culture Collection bajo la designación HA022CL1 y tiene el número de acceso CRL 11177.

En aún otras realizaciones preferidas, la especificidad de unión para un receptor Fc es proporcionada por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humana, por ejemplo, un receptor Fc-alfa [Fc $\alpha$ RI (CD89)], cuya unión no está preferiblemente bloqueada por la inmunoglobulina A humana (IgA). Se pretende que el término "receptor de IgA" incluya el producto génico de un gen  $\alpha$  (Fc $\alpha$ RI) situado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas transmembrana empalmadas alternativamente de 55 a 110 kDa. Fc $\alpha$ RI (CD89) se expresa constitutivamente en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. Fc $\alpha$ RI tiene una afinidad media ( $\approx 5 \times 10^7$  M<sup>-1</sup>) tanto para IgA1 como para IgA2, que se incrementa tras la exposición a citoquinas tales como G-CSF o GM-CSF [Morton, H.C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16: 423-440]. Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de Fc $\alpha$ RI, identificados

como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc $\alpha$ RI fuera del dominio de unión al ligando de IgA, [Monteiro, R.C. et al. (1992) J. Immunol. 148: 1764].

Fc $\alpha$ RI y Fc $\gamma$ RI son receptores activadores preferidos para su uso en las moléculas biespecíficas de la invención porque son (1) expresadas principalmente en células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) expresada a niveles elevados (por ejemplo, 5.000-100.000 por célula); (3) mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo ADCC, fagocitosis); y (4) mediar la presentación mejorada del antígeno de los antígenos, incluyendo autoantígenos, dirigidos a ellos.

Los anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas de la invención son anticuerpos monoclonales murinos, humanos, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas de la presente invención se pueden preparar conjugando las especificidades de unión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR, anti-CD3, anti-CD5 y anti-BST1, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la especificidad de unión de cada molécula biespecífica puede ser generada por separado y luego conjugada entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede usar una variedad de agentes de acoplamiento o entrecruzamiento para la conjugación covalente. Ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen la proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) [véase por ejemplo Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Medicina. 160: 1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648]. Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229: 81-83, y Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375. Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles a través de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)].

Se ha realizado trabajo bivalente adicional para biespecíficos mediante modificación de doble unión en formatos de anticuerpo de longitud completa (Wu et al., 2007, Nature Biotechnology 25 [11]: 1290-1297, USSN 12/477.711, Michaelson et al., 2009, mAbs 1 [2]: 128-141, PCT/US2008/074693, Zuo et al., 2000, Protein Engineering 13 [5]: 361-367; USSN 09/865, 198; Shen et al. Biol Chem 281 [16]: 10706-10714, Lu et al., 2005, J Biol Chem 280 [20]: 19665-19662; PCT/US2005/025472).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden conjugarse mediante la unión de sulfhidrilo de las regiones bisagra del extremo terminal C de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región bisagra se modifica para contener un número impar de residuos sulfhidrilo, preferiblemente uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión se pueden codificar en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de la invención puede ser una molécula de cadena única que comprende un anticuerpo de cadena única y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 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 ser confirmada, por ejemplo, por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (por ejemplo, inhibición del crecimiento) o ensayo de transferencia Western. Cada uno de estos ensayos detecta generalmente la presencia de complejos proteína-anticuerpo de particular interés empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos FcR-anticuerpo pueden detectarse usando, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a enzima que reconoce y se une específicamente a los complejos de anticuerpo-FcR. Alternativamente, los complejos pueden detectarse usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse en forma radioactiva y utilizarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, The Endocrine Society, marzo de 1986). El isótopo radiactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador  $\gamma$  o un contador de centelleo o por autorradiografía.

Fragmentos de anticuerpos y miméticos de anticuerpos

La presente invención no se limita a anticuerpos tradicionales y puede practicarse mediante el uso de fragmentos de anticuerpo. Como se detalla a continuación, se ha desarrollado una amplia variedad de fragmentos de anticuerpos y tecnologías de miméticos de anticuerpos y son ampliamente conocidos en la técnica. Mientras que varias de estas tecnologías, tales como anticuerpos de dominio, Nanocuerpos y Unicuerpos hacen uso de fragmentos de, u otras modificaciones a, estructuras de anticuerpos tradicionales, también hay tecnologías alternativas, tales como Afficuerpos, DARPins, Anticalinas, Avimeros y Versacuerpos que emplean estructuras de unión que, aunque imitan la unión de anticuerpo tradicional, se generan a partir de y funcionan a través de mecanismos distintos.

Los anticuerpos de dominio (dAb) son las unidades de unión funcional más pequeñas de anticuerpos, que corresponden a las regiones variables ya sea de las cadenas pesadas ( $V_H$ ) o ligeras ( $V_L$ ) de anticuerpos humanos. Los anticuerpos de dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Domantis ha desarrollado una serie de bibliotecas grandes y altamente funcionales de dAb de  $V_H$  y  $V_L$  completamente humanas (más de diez mil millones de secuencias diferentes en cada biblioteca), y utiliza estas bibliotecas para seleccionar dAb que son específicos para objetivos terapéuticos. En contraste con muchos anticuerpos convencionales, los anticuerpos del dominio están bien expresados en sistemas de células bacterianas, de levadura y de mamíferos. Pueden obtenerse más detalles de anticuerpos de dominio y métodos de producción de los mismos mediante referencia a las patentes de Estados Unidos Nos. 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; 6.696.245; la solicitud de patente estadounidense No. 2004/0110941; La solicitud de patente europea No. 1433846 y las patentes europeas 0368684 y 0616640; los documentos WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609.

Los Nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de anticuerpos de cadena pesada de origen natural. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes ( $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ ). 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 original de cadena pesada. Los Nanocuerpos tienen una alta homología con los dominios  $V_H$  de anticuerpos humanos y pueden humanizarse más sin ninguna pérdida de actividad. Es importante destacar que los Nanocuerpos tienen un potencial inmunogénico bajo, lo que se ha confirmado en estudios de primates con compuestos de plomo de Nanocuerpos.

Los Nanocuerpos combinan las ventajas de anticuerpos convencionales con características importantes de fármacos de moléculas pequeñas. Al igual que los anticuerpos convencionales, los Nanocuerpos muestran alta especificidad 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 Nanocuerpos son extremadamente estables, se pueden administrar por medios distintos a la inyección (véase, por ejemplo, el documento WO 04/041867) y son fáciles de fabricar. Otras ventajas de los Nanocuerpos incluyen el reconocimiento de epítomos poco comunes u ocultos como resultado de su pequeño tamaño, la unión en cavidades o sitios activos de objetivos proteínicos con alta afinidad y selectividad debido a su flexibilidad única en el formato de fármaco tridimensional, la adaptación de la semivida y la facilidad y velocidad de descubrimiento de fármacos.

Los Nanocuerpos están codificados por genes individuales y se producen eficientemente en casi todos los huéspedes procariotas y eucariotas, por ejemplo, *E. coli* (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6.765.087), moldes (por ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6.838.254). El proceso de producción es escalable y se han producido cantidades de Nanocuerpos de varios kilogramos. Dado que los Nanocuerpos exhiben una estabilidad superior en comparación con los anticuerpos convencionales, pueden formularse como una solución lista para usar de larga vida útil.

El método de Nanoclones (véase, por ejemplo, el documento WO 06/079372) es un método patentado para generar Nanocuerpos contra un objetivo deseado, con base en la selección automatizada de alto rendimiento de células B y podría utilizarse en el contexto de la presente divulgación.

Los Unicuerpos son otra tecnología de fragmentos de anticuerpos; sin embargo, éste se basa en la eliminación de la región bisagra de los anticuerpos IgG4. La supresión de la región bisagra da como resultado 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. También es bien conocido 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 inmune y esta ventaja se transmite a Unicuerpos. Por ejemplo, los Unicuerpos puede funcionar para inhibir o silenciar, pero no para matar, las células a las que están unidos. Además, la unión de un Unicuerpo a las células cancerosas, no las estimulan a proliferar. Además, debido a que los Unicuerpos son aproximadamente la mitad del tamaño de anticuerpos IgG4 tradicionales, pueden mostrar una mejor distribución sobre tumores sólidos más grandes con una eficacia potencialmente ventajosa. Los Unicuerpos se eliminan del cuerpo a una velocidad similar a los anticuerpos IgG4 enteros y son capaces de unirse con una afinidad similar por sus antígenos como anticuerpos enteros. Pueden obtenerse más detalles de Unicuerpos mediante referencia a la publicación de patente WO2007/059782.

Las moléculas de Afficuerpo representan una nueva clase de proteínas de afinidad basadas en un dominio de proteína de 58 residuos de aminoácidos, derivado de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína estafilocócica A. Este dominio de haz de tres hélices se ha utilizado como una estructura para la construcción de bibliotecas combinatorias de fagémidos, a partir de las cuales se pueden seleccionar variantes de Afficuerpo que se dirigen a las moléculas deseadas usando tecnología de despliegue en fagos [Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA (1997) 'Binding proteins selected from combinatorial libraries of an  $\alpha$ -helical bacterial receptor domain' Nat Biotechnol 15: 772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA (2002) 'Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A' Eur J Biochem. 269: 2647-55.]. La estructura simple y robusta de moléculas de Afficuerpo 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. et al. (2002) 'Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*' J Immunol Methods 261: 199-211] e inhibir las interacciones de los receptores [Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA (2003) 'Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering' Protein Eng. 16: 691-7]. Pueden obtenerse más detalles de los Afficuerpos y métodos de producción de los mismos mediante referencia a la patente de Estados Unidos No. 5831012.

Los Afficuerpos marcados también pueden ser útiles en aplicaciones de formación de imágenes para determinar la abundancia de isoformas.

Las DARPins (proteínas de repetición diseñadas de anquirina) son un ejemplo de una tecnología de DRP (proteína de repetición diseñada) mimética de anticuerpos que se ha desarrollado para explotar las capacidades de unión de polipéptidos no anticuerpos. Las proteínas de repetición tales como anquirina o proteínas de repetición ricas en leucina, son moléculas de unión omnipresentes, que ocurren, a diferencia de los anticuerpos, intra y extracelularmente. Su arquitectura modular única presenta unidades estructurales repetitivas (repeticiones) que se acumulan para formar dominios de repetición alargados que muestran superficies variables y modulares de unión a objetivos. Basándose en esta modularidad, se pueden generar bibliotecas 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 ensamblaje aleatorio en dominios de repetición.

Las DARPins se pueden producir en sistemas de expresión bacterianos con muy altos rendimientos y pertenecen a las proteínas más estables conocidas. Se han seleccionado DARPins altamente específicas y de alta afinidad para una amplia gama de proteínas objetivo, incluyendo receptores humanos, citoquinas, quinasas, proteasas humanas, virus y proteínas de membrana. Se pueden obtener DARPins que tienen afinidades en el intervalo nanomolar a picomolar de un sólo dígito.

Se han utilizado DARPins en una amplia gama de aplicaciones, incluyendo ELISA, ELISA en sándwich, análisis de citometría de flujo (FACS), inmunohistoquímica (IHC), aplicaciones en chips, purificación por afinidad o transferencia Western. Las DARPins también demostraron ser altamente activas en el compartimento intracelular, por ejemplo, como proteínas marcadoras intracelulares fusionadas con la proteína fluorescente verde (GFP). Las DARPins se utilizaron además para inhibir la entrada viral con IC50 en el intervalo pM. Las DARPins no sólo son ideales para bloquear las interacciones proteína-proteína, sino también para inhibir las enzimas. Las proteasas, quinasas y transportadores han sido inhibidas con éxito, más a menudo un modo de inhibición alostérica. Los enriquecimientos muy rápidos y específicos sobre el tumor y las relaciones muy favorables entre el tumor y la sangre hacen que las DARPins sean adecuadas para el diagnóstico *in vivo* o los enfoques terapéuticos.

Se puede encontrar información adicional sobre DARPins y otras tecnologías de DRP en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2004/0132028, y en la publicación internacional de patente No. WO 02/20565.

Las anticalinas son una tecnología adicional mimética de anticuerpos. Sin embargo, en este caso, la especificidad de unión se deriva de lipocalinas, una familia de proteínas de bajo peso molecular que se expresan de forma natural y abundante en tejidos humanos y fluidos corporales. Las lipocalinas han evolucionado para llevar a cabo una serie 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 bucles en un extremo terminal de la proteína. Estos bucles 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 lipocalinas individuales.

Aunque la estructura global de los bucles hipervariables soportados por una estructura de lámina  $\beta$  conservada recuerda a las inmunoglobulinas, las lipocalinas difieren considerablemente de los anticuerpos en términos de tamaño, estando compuestas por una única cadena polipeptídica de 160-180 aminoácidos que es marginalmente mayor que un único dominio de inmunoglobulina.

Las lipocalinas se clonan y sus bucles se someten a modificación para crear Anticalinas. Se han generado bibliotecas de Anticalinas estructuralmente diversas y el despliegue de Anticalina permite la selección y cribado de la función de unión, seguido por la expresión y producción de proteína soluble para análisis adicional en sistemas procariontes o eucariotes. Los estudios han demostrado con éxito que pueden desarrollarse Anticalinas que son específicas para prácticamente cualquier proteína objetivo humana y se pueden obtener afinidades de unión en el rango nanomolar o superior.

Las anticalinas también pueden formatearse como proteínas de doble objetivo, denominadas Duocalinas. Una Duocalina se une a dos objetivos terapéuticos separados en una proteína monomérica de fácil producción usando procedimientos de fabricación estándar, conservando al mismo tiempo la especificidad y afinidad objetivo independientemente de la orientación estructural de sus dos dominios de unión.

La modulación de objetivos múltiples a través de una sola molécula es particularmente ventajosa en enfermedades que se sabe que implican más de un solo factor causal. Además, los formatos de unión bivalentes o multivalentes

tales como las Duocalinas tienen un potencial significativo para dirigir las moléculas de la superficie celular en la enfermedad, mediando los efectos agonistas en las vías de transducción de señal o induciendo efectos de internalización mejorados mediante unión y agrupamiento de receptores de superficie celular. Además, la alta estabilidad intrínseca de las Duocalinas es comparable a las Anticalinas monoméricas, ofreciendo una formulación flexible y potencial de suministro para Duocalinas.

Se puede encontrar información adicional con respecto a las Anticalinas en la patente de Estados Unidos No. 7.250.297 y en la publicación internacional de patente No. WO 99/16873.

Otra tecnología mimética de anticuerpo útil en el contexto de la presente divulgación son los Avimeros. Los Avimeros evolucionan a partir de una gran familia de dominios de receptores extracelulares humanos mediante el arrastre *in vitro* del exón y el despliegue en fagos, generando proteínas multidominio con propiedades de unión e inhibidoras. Se ha demostrado que el enlazamiento de múltiples dominios de unión independientes crea avidéz y da como resultado una afinidad y una especificidad mejoradas en comparación con las proteínas de unión convencionales a un solo epítipo. Otras ventajas potenciales incluyen la producción simple y eficiente de moléculas específicas multiobjetivo en *Escherichia coli*, termoestabilidad mejorada y resistencia a proteasas. Los Avimeros con afinidades subnanomolares se han obtenido contra una variedad de objetivos.

Se puede encontrar información adicional con respecto a los Avimeros en las publicaciones de las solicitudes de patente de Estados Unidos Nos. 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756.

Los Versacuerpos son otra tecnología mimética de anticuerpos que podría utilizarse en el contexto de la presente divulgación. Los Versacuerpos son proteínas pequeñas 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. La sustitución de un gran número de aminoácidos hidrofóbicos, que comprende el núcleo hidrofóbico, con un número pequeño de disulfuros da como resultado una proteína que es más pequeña, más hidrofílica (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 hidrofóbicos. Estas cuatro propiedades son bien conocidas por afectar la inmunogenicidad, y se espera que juntas causen una gran disminución en la inmunogenicidad.

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

Dado la estructura de Versacuerpos, estos miméticos de anticuerpos ofrecen un formato versátil que incluye multivalencia, multiespecificidad, una diversidad de mecanismos de semivida, módulos de direccionamiento al tejido y la ausencia de la región Fc del anticuerpo. Además, los Versacuerpos se fabrican en *E. Coli* con alto rendimiento, y debido a su hidrofiliidad y tamaño pequeño, los Versacuerpos son muy solubles y pueden ser formulados a altas concentraciones. Los Versacuerpos son excepcionalmente estables al calor (pueden ser hervidos) y ofrecen una vida útil prolongada.

Se puede encontrar información adicional sobre Versacuerpos en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2007/0191272.

La descripción detallada del fragmento de anticuerpo y las tecnologías miméticas de anticuerpos proporcionadas anteriormente no pretende ser una lista exhaustiva de todas las tecnologías que podrían utilizarse en el contexto de la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, y también no a modo de limitación, podrían utilizarse una variedad de tecnologías adicionales que incluyen tecnologías basadas en polipéptidos alternativos, tales como fusiones de regiones determinantes de complementariedad como se describe en Qui et al. (2007) Nature Biotechnology 25 (8): 921-929, así como tecnologías basadas en ácidos nucleicos, tales como las tecnologías de aptámeros de ARN descritas en las patentes de Estados Unidos Nos. 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 y 6.387.620 en el contexto de la presente divulgación.

#### Composiciones farmacéuticas

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

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación también se pueden administrar en terapia de combinación, es

decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo de la presente invención combinado con al menos otro agente antitumoral, o un agente antiinflamatorio o inmunosupresor. Ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden usar en terapia de combinación se describen con mayor detalle a continuación en la sección sobre usos de los anticuerpos de la invención.

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, inmuoconjugado 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.

10 Los compuestos farmacéuticos de la divulgación pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte efectos toxicológicos no deseados [véase, por ejemplo, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19]. Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como los ácidos clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

15 Una composición farmacéutica de la divulgación también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio 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 metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

20 Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y por el uso de tensoactivos.

25 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto por procedimientos de esterilización, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol-sorbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser lograda por la inclusión de agentes que retrasan la absorción tal como monoestearato de aluminio y gelatina.

30 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la divulgación. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

35 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 vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensoactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

40 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se

requiera, seguido por microfiltración por esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material portador para producir una única forma de dosificación será generalmente la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de un 100 por ciento, esta cantidad oscilará entre aproximadamente 0,01 por ciento y aproximadamente 99 por ciento de ingrediente activo, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 70 por ciento, lo más preferiblemente entre aproximadamente 1 por ciento y aproximadamente 30 por ciento del ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación tal como se usa en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la divulgación está dictada por y directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se ha de conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Para la administración del anticuerpo, la dosis oscila entre aproximadamente 0,0001 y 100 mg/kg, y más usualmente entre 0,01 y 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 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 ejemplo de un régimen de tratamiento 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-BST1 de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, administrándose el anticuerpo usando uno de los siguientes esquemas de dosificación: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, luego cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, se administran dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión simultáneamente, 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 midiendo los niveles en sangre de anticuerpo con respecto al antígeno objetivo en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1.000 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 dosis y la frecuencia varían dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguida de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos no humanos. La dosis y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación 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, a veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina la progresión de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Posteriormente, se puede administrar al paciente un régimen profiláctico.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente 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 de la presente invención empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto

particular que está siendo empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, el estado general de salud y la historia médica previa del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

5 Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-BST1 de la invención da lugar preferiblemente a una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento de la frecuencia y duración de los períodos libres de síntomas de la enfermedad o una prevención del deterioro o discapacidad debida a la aflicción causada por la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de los tumores mediado por BST1, una "dosificación terapéuticamente eficaz" inhibe preferiblemente el crecimiento celular o el crecimiento tumoral en al menos  
10 aproximadamente 20%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 40%, aún más preferiblemente en al menos aproximadamente 60% , y aún más preferiblemente en al menos aproximadamente 80% con respecto a sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral puede evaluarse en un sistema modelo animal predictivo de eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, tal  
15 inhibición puede medirse *in vitro* mediante ensayos conocidos por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de otro modo los síntomas en un sujeto. Un experto en la técnica podría determinar tales cantidades con base en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particular seleccionada.

20 Una composición de la presente invención se puede administrar mediante una o más vías de administración usando uno o más de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración preferidas para los anticuerpos de la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales, por ejemplo, por inyección o infusión. La frase  
25 "administración parenteral" tal como se usa en la presente memoria significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal e infusión.

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

Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno, acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos  
35 para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica [véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (1978) J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y].

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, se puede administrar una composición terapéutica de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos divulgados en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos útiles bien conocidos en la presente invención incluyen: la patente de Estados Unidos No. 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamento a una velocidad controlada; la patente de Estados Unidos No. 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de Estados Unidos No. 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicación para suministrar una medicación a una velocidad de infusión precisa; la patente de Estados Unidos No. 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; la patente de Estados Unidos No. 4.439.196, que divulga un sistema osmótico de suministro de fármaco que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y la patente de Estados Unidos No. 4.475.196, que divulga un sistema osmótico de suministro de fármaco. Muchos otros de tales implantes, sistemas de suministro y módulos son conocidos por los expertos en la  
50 técnica.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales de la invención pueden formularse para asegurar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención atraviesen la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o más fracciones que se transportan selectivamente dentro de células u órganos específicos, mejorando así el suministro dirigido de fármacos [véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685]. Los ejemplos de fracciones de direccionamiento incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.416.016); manósidos [Umezawa et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038]; anticuerpos [P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357: 140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother.

39: 180]; el receptor de proteína A tensoactivo [Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134]; p120 [Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269: 9090]; véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346: 123; J.J. Killion; I.j. Fidler (1994) Immunomethods 4: 273.

#### Usos y métodos

- 5 Los anticuerpos, composiciones de anticuerpos y métodos de la presente invención tienen numerosas propiedades diagnósticas y terapéuticas *in vitro* e *in vivo* que implican el diagnóstico y tratamiento de trastornos mediados por BST1.

En algunas realizaciones, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo*, o a seres humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y diagnosticar una variedad de trastornos. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término sujeto pretende incluir animales humanos y no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, 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 de BST1. Los métodos son particularmente adecuados para tratar pacientes humanos que tienen un trastorno asociado con la expresión aberrante de BST1. Cuando se administran anticuerpos para BST1 junto con otro agente, los dos se pueden administrar en cualquier orden o simultáneamente.

Dada la unión específica de los anticuerpos de la invención para BST1, los anticuerpos de la invención pueden usarse para detectar específicamente la expresión de BST1 en la superficie de células y, además, pueden usarse para purificar BST1 mediante purificación por inmovinoafinidad.

Además, dada la expresión de BST1 en células tumorales, los anticuerpos, composiciones de anticuerpos y métodos de la presente invención se pueden usar para tratar un sujeto con un trastorno tumorigénico, por ejemplo, un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan BST1 incluyendo, por ejemplo, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica de células B, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y cáncer pancreático. Se ha demostrado que BST1 se interioriza en la unión del anticuerpo como se ilustra en el Ejemplo 5 a continuación, permitiendo de este modo que los anticuerpos de la invención se utilicen en cualquier mecanismo de carga útil de acción, por ejemplo, un enfoque ADC, un radioinmunoconjugado o un enfoque ADEPT.

En un ejemplo, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas y composiciones multiespecíficas y biespecíficas) de la divulgación se pueden usar para detectar niveles de BST1, o niveles de células que contienen BST1 en su superficie de membrana, niveles que pueden ser entonces vinculados a ciertos síntomas de la enfermedad. Alternativamente, los anticuerpos pueden usarse para inhibir o bloquear la función de BST1 que, a su vez, se puede vincular a la prevención o mejora de ciertos síntomas de la enfermedad, implicando de este modo el BST1 como mediador de la enfermedad. Esto puede conseguirse poniendo en contacto una muestra y una muestra de control con el anticuerpo anti-BST1 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y BST1. Cualquiera de los complejos formados entre el anticuerpo y el BST1 se detectan y comparan en la muestra y el control.

En otro ejemplo, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas y composiciones multiespecíficas y biespecíficas) de la divulgación se pueden ensayar inicialmente con respecto a la actividad de unión asociada con uso terapéutico o de diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la divulgación pueden ensayarse usando los ensayos de citometría de flujo descritos en los Ejemplos siguientes.

Los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecíficas y biespecíficas, inmunoconjugados y composiciones) de la invención tienen utilidad adicional en la terapia de enfermedades relacionadas con BST1. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales, las moléculas multiespecíficas o biespecíficas y los inmunoconjugados pueden utilizarse para provocar *in vivo* o *in vitro*, una o más de las siguientes actividades biológicas: inhibir el crecimiento de y/o matar una célula que expresa BST1; para mediar la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa BST1 en presencia de células efectoras humanas, o para bloquear la unión del ligando de BST1 a BST1.

En una realización particular, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas y composiciones multiespecíficas y biespecíficas) se usan para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de enfermedades relacionadas con BST1. Ejemplos de enfermedades relacionadas con BST1 incluyen, entre otras, tejidos cancerosos humanos que representan leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica de células B, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y cáncer pancreático.

Las rutas adecuadas para administrar las composiciones de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden ser seleccionadas por los expertos en la materia. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos pueden administrarse mediante inyección (por ejemplo, intravenosa o subcutánea). Las dosis adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y de la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpo.

Como se ha descrito previamente, los anticuerpos anti-BST1 de la invención pueden coadministrarse con uno u otros agentes terapéuticos más, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede estar unido al agente (como un inmunocomplejo) o puede ser administrado separadamente del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o puede coadministrarse con otros tratamientos conocidos, por ejemplo, una terapia anticancerígena, por ejemplo, radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos, tales como doxorubicina (adriamicina), sulfato de bleomicina cisplatino, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida e hidroxiurea que, por sí mismos, sólo son eficaces a niveles que son tóxicos o casi tóxicos 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 como una dosis de 60-75 mg/mL una vez cada 21 días. Otros agentes adecuados para la coadministración con los anticuerpos de la invención incluyen otros agentes usados para el tratamiento de cánceres, por ejemplo, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica de células B, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario o cáncer pancreático, tales como Avastin®, 5FU y gemcitabina. La coadministración de los anticuerpos anti-BST1 o fragmentos de unión al antígeno del mismo 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. Dicha coadministración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las harían no reactivas con el anticuerpo.

Células efectoras específicas del objetivo, por ejemplo, las células efectoras unidas a composiciones (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención también pueden usarse como agentes terapéuticos. Las células efectoras para direccionamiento pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células asesinas naturales y otras células portadoras del receptor de IgG o IgA. Si se desea, se pueden obtener células efectoras del sujeto a tratar. Las células efectoras específicas del objetivo se pueden administrar como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede ser del orden de  $10^8$  -  $10^9$ , pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización en la célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral que expresa BST1, y para afectar la muerte celular, por ejemplo, por fagocitosis. Las vías de administración también pueden variar.

La terapia con células efectoras específicas de objetivo puede realizarse conjuntamente con otras técnicas para la remoción de células objetivo. Por ejemplo, la terapia antitumoral utilizando las composiciones (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención y/o células efectoras armadas con estas composiciones pueden usarse junto con quimioterapia. Además, la inmunoterapia combinada puede usarse para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas al rechazo de células tumorales. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos anti-BST1 unidos a anti-Fc-gamma RI o anti-CD3 junto con agentes de unión específicos de receptor de IgG o IgA.

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la invención también pueden usarse para modular los niveles de FcγR o FcγR en células efectoras, tal como mediante recubrimiento y eliminación de receptores en la superficie celular. También se pueden usar mezclas de receptores anti-Fc para este fin.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención que tienen sitios de unión del complemento, tales como porciones de IgG1, IgG2, o IgG3 o IgM que se unen al complemento, también se pueden usar en presencia del complemento. En una realización, el tratamiento *ex vivo* de una población de células que comprende células objetivo con un agente aglutinante de la invención y células efectoras apropiadas puede complementarse mediante la adición de complemento o complemento que contiene suero. La fagocitosis de células objetivo recubiertas con un agente aglutinante de la invención puede mejorarse mediante la unión de proteínas del complemento. En otra realización, las células objetivo recubiertas con las composiciones (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención también pueden lisarse por el complemento. En otra realización más, las composiciones de la invención no activan al complemento.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención pueden administrarse también junto con complemento. En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona composiciones que comprenden anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones pueden ser ventajosas cuando el complemento está situado en estrecha proximidad con los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas. Alternativamente, los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la invención y el complemento o suero se pueden administrar por separado.

También dentro del alcance de la presente divulgación están kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos monoclonales, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o inmunoconjugados) e instrucciones de 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 adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad complementaria que se une a un

epítopo en el antígeno BST1 distinto del primer anticuerpo).

Por consiguiente, los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la invención pueden administrarse adicionalmente (antes, simultáneamente o después de la administración de un anticuerpo de la invención) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que mejora o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos.

En otras realizaciones, el sujeto puede tratarse adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo, mejora o inhibe la expresión o actividad de los receptores Fcγ o Fcγ mediante, por ejemplo, el tratamiento del 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-macrófagos (GM-CSF), el interferón γ (IFN-γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la divulgación también pueden usarse para dirigirse a células que expresan FcγR o BST1, por ejemplo, para marcar dichas células. Para tal uso, el agente aglutinante puede estar unido a una molécula que puede ser detectada. De este modo, la divulgación proporciona métodos para localizar células *ex vivo* o *in vitro* que expresan receptores Fc, tales como FcγR o BST1. El marcador detectable puede ser, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático.

En un ejemplo particular, la divulgación proporciona métodos para detectar la presencia del antígeno BST1 en una muestra, o medir la cantidad del antígeno BST1, que comprende poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal, o una que se une específicamente a BST1, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o una porción del mismo y BST1. La formación de un complejo se detecta entonces, en donde una diferencia de formación de complejos entre la muestra comparada con la muestra de control es indicativa de la presencia del antígeno BST1 en la muestra.

En otros ejemplos, la divulgación proporciona métodos para tratar un trastorno mediado por BST1 en un sujeto, por ejemplo, cánceres humanos y enfermedad inflamatoria humana, incluyendo las enfermedades de la invención.

En otro ejemplo más, los inmunoconjugados de la invención pueden usarse para dirigir compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, radiotoxinas, inmunosupresores, etc.) a células que tienen receptores de superficie celular BST1 uniendo dichos compuestos al anticuerpo. Por ejemplo, se puede conjugar un anticuerpo anti-BST1 con cualquiera de los compuestos de toxina descritos en las patentes de Estados Unidos Nos. 6.281.354 y 6.548.530, las publicaciones de patente estadounidenses Nos. 2003/0050331, 2003/0064984, 2003/0073852 y 2004/0087497, o publicados en el documento WO 03/022806. Por lo tanto, la divulgación también proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vivo* células que expresan BST1 (por ejemplo, con un marcador detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático). Alternativamente, los inmunoconjugados se pueden usar para matar células que tienen receptores de superficie celular BST1 dirigiendo citotoxinas o radiotoxinas a BST1.

Todas las referencias citadas en esta memoria descriptiva, incluyendo sin limitación todos los artículos, publicaciones, patentes, solicitudes de patente, presentaciones, textos, informes, manuscritos, folletos, libros, publicaciones en la Internet, artículos de revistas, publicaciones periódicas, hojas de datos de productos y similares. La discusión de las referencias en este documento pretende simplemente resumir las aseveraciones hechas por sus autores y no se admite que ninguna referencia constituya el estado de la técnica y los solicitantes se reservan el derecho de cuestionar la exactitud y pertinencia de las referencias citadas.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no deben ser interpretados como limitantes adicionales.

Ejemplo 1: Construcción de una biblioteca de despliegue en fagos

Se sintetizó eucarióticamente una proteína recombinante compuesta de los aminoácidos 29-292 de BST1 (SEQ ID NO: 44) por métodos recombinantes estándar y se usó como antígeno para la inmunización.

Inmunización y aislamiento de ARNm

Se construyó una biblioteca de despliegue en fagos para la identificación de las moléculas que se unen a BST1 como sigue. Se inmunizaron intraperitonealmente ratones A/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Me.) con el antígeno BST1 recombinante (el dominio extracelular), usando 100 µg de proteína en adyuvante completo de Freund, el día 0 y con 100 µg de antígeno el día 28. Se obtuvieron muestras de sangre de ratones a través de la punción del seno retro-orbital. Si, ensayando los títulos, se consideraron altos por ELISA usando el antígeno BST1 biotinilado inmovilizado mediante placas de poliestireno recubiertas con de neutravidina, NeutrAvidin<sup>MR</sup>, (Reacti-Bind<sup>MR</sup>), Pierce, Rockford, IL), los ratones fueron reforzados con 100 µg de proteína el día 70, 71 y 72, con el sacrificio posterior y esplenectomía el día 77. Si los títulos de anticuerpo no se consideraban satisfactorios, los ratones recibieron refuerzo con 100 µg de antígeno el día 56 y se tomó una muestra de sangre el día 63. Si se obtuvieron títulos satisfactorios, los animales recibieron un refuerzo con 100 µg de antígeno el día 98, 99 y 100 y se

recogieron los bazos el día 105.

Los bazos se recogieron en una campana de flujo laminar y se transfirieron a una placa de Petri, recortando y descartando grasa y tejido conectivo. Los bazos se maceraron rápidamente con el émbolo de una jeringa estéril de 5 cc en presencia de 1,0 mL de solución D (25,0 g de tiocianato de guanidina (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Ind.), 29,3 mL de agua estéril, 1,76 mL de citrato de sodio 0,75 M, pH 7,0, 2,64 mL de Sarkosyl al 10% (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), 0,36 mL de 2-mercaptoetanol (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.). Esta suspensión de bazo se retiró a través de una aguja de calibre 18 hasta que todas las células se lisaron y se transfirió la solución viscosa a un tubo de microcentrífuga. La placa de Petri se lavó con 100  $\mu$ L de solución D para recuperar cualquier bazo restante. Esta suspensión se tiró a continuación a través de una aguja de calibre 22 de 5 a 10 veces más.

La muestra se dividió uniformemente entre dos tubos de microcentrífuga y se añadió lo siguiente, en orden, mezclando por inversión de los tubos después de cada adición: 50  $\mu$ L de acetato de sodio 2 M pH 4,0, 0,5 mL de fenol saturado con agua (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.), 100  $\mu$ L de cloroformo/alcohol isoamílico en proporción 49:1 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pa.). La solución se agitó mediante formación de vórtice durante 10 segundos y se incubó en hielo durante 15 min. Después de la centrifugación a 14 krpm durante 20 minutos a 2-8°C, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. Se añadió un volumen igual de fenol saturado con agua:cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1), y el tubo se sometió a agitación tipo vórtice durante diez segundos. Después de 15 min de incubación sobre hielo, la muestra se centrifugó durante 20 minutos a 2-8°C y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó con un volumen igual de isopropanol a -20°C durante un mínimo de 30 min. Después de la centrifugación a 14 krpm durante 20 minutos a 4°C, se aspiró el sobrenadante, los tubos se centrifugaron brevemente y se retiraron todas las trazas de líquido del sedimento de ARN.

Se disolvieron los sedimentos de ARN en 300  $\mu$ L de solución D, se combinaron y se precipitaron con un volumen igual de isopropanol a -20°C durante un mínimo de 30 min. La muestra se centrifugó 14 krpm durante 20 minutos a 4°C, el sobrenadante se aspiró como antes, y la muestra se enjuagó con 100  $\mu$ L de etanol al 70% enfriado con hielo. La muestra se centrifugó nuevamente 14 krpm durante 20 minutos a 4°C, se aspiró la solución de etanol al 70%, y se secó al vacío el sedimento de ARN. Se resuspendió el sedimento en 100  $\mu$ L de agua tratada con pirocarbonato de dietilo estéril. La concentración se determinó mediante A260 usando una absorbancia de 1,0 para una concentración de 40  $\mu$ g/mL. Los ARN se almacenaron a -80°C.

#### Preparación de ADN complementario (ADNc)

El ARN total purificado a partir de bazos de ratón como se ha descrito anteriormente se usó directamente como molde para la preparación de ADNc. Se diluyó ARN (50  $\mu$ g) hasta 100  $\mu$ L con agua estéril y se añadieron 10  $\mu$ L de oligo dT12 a una concentración de 130 ng/ $\mu$ L (sintetizado en el sintetizador de ADN Applied Biosystems Modelo 392). La muestra se calentó durante 10 min a 70°C, luego se enfrió sobre hielo. Se añadieron 40  $\mu$ L de regulador de primera cadena 5' (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.), junto con 20  $\mu$ L de ditiotreitól 0,1 M (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD), 10  $\mu$ L de trifosfatos de desoxinucleósido 20 mM (dNTP, Boehringer Mannheim, Indianápolis, Ind.) y 10  $\mu$ L de agua sobre hielo. La muestra se incubó entonces a 37°C durante 2 min. Se añadieron 10  $\mu$ L de transcriptasa inversa II (Superscript<sup>MIR</sup>, Gibco/BRL, Gaithersburg, Md) y se continuó la incubación a 37°C durante 1 h. Los productos de ADNc se usaron directamente para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### Amplificación de genes de anticuerpos por PCR

Para amplificar sustancialmente todos los genes de cadena H y L usando PCR, se escogieron cebadores que correspondían sustancialmente a todas las secuencias publicadas. Debido a que las secuencias de nucleótidos de los terminales amino de H y L contienen una diversidad considerable, se sintetizaron 33 oligonucleótidos para servir como cebadores 5' para las cadenas H, y se sintetizaron 29 oligonucleótidos para servir como cebadores 5' para las cadenas L kappa como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 6.555.310. Las secuencias de nucleótidos de la región constante para cada cadena requerían solo un cebador 3' para las cadenas H y un cebador 3' para las cadenas L kappa.

Se realizó una reacción de 50  $\mu$ L para cada par de cebadores con 50  $\mu$ mol de cebador 5', 50  $\mu$ mol de cebador 3', 0,25  $\mu$ L de Taq ADN Polimerasa (5 unidades/ $\mu$ L, Boehringer Mannheim, Indianápolis, Ind.), 3  $\mu$ L de ADNc (preparado como se describe), 5  $\mu$ L de dNTP 2 mM, 5  $\mu$ L de regulador 10\*Taq ADN polimerasa con MgCl<sub>2</sub> (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Ind.) y H<sub>2</sub>O hasta 50  $\mu$ L. La amplificación se realizó usando un termociclador GeneAmp® 9600 (Perkin Elmer, Foster City, CA) con el siguiente programa del termociclador: 94°C durante 1 min; 30 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, 72°C durante 6 min; 4°C.

Los productos de ADNbc del proceso de PCR se sometieron entonces a PCR asimétrica usando sólo un cebador 3' para generar sustancialmente sólo la cadena antisentido de los genes objetivo. Se realizó una reacción de 100  $\mu$ L para cada producto ADNbc con 200  $\mu$ moles de cebador 3', 2  $\mu$ L de producto ADNbc, 0,5  $\mu$ L de Taq ADN polimerasa, 10  $\mu$ L de dNTP 2 mM, 10  $\mu$ L de regulador 10\*Taq ADN polimerasa con MgCl<sub>2</sub> (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Ind.), y H<sub>2</sub>O hasta 100  $\mu$ L. El mismo programa de PCR descrito anteriormente se usó para amplificar el ADN monocatenario (ADNmc).

Purificación de ADN monocatenario por cromatografía líquida de alto rendimiento y transferencia de fosfatos de ADN monocatenario

Los productos de PCR monocatenarios de cadena H y los productos de PCR monocatenarios de cadena L se precipitaron en etanol mediante la adición de 2,5 volúmenes de etanol y 0,2 volumen de acetato de amonio 7,5 M e incubando a -20°C durante al menos 30 min. El ADN se sedimentó por centrifugación en una centrífuga Eppendorf a 14 krpm durante 10 min a 2-8°C. Se aspiró cuidadosamente el sobrenadante, y los tubos se centrifugaron brevemente una segunda vez. La última gota del sobrenadante se retiró con una pipeta. El ADN se secó al vacío durante 10 minutos a temperatura media. Los productos de la cadena H se agruparon en 210 µL de agua y los productos de la cadena L se agruparon por separado en 210 µL de agua. El ADN monocatenario se purificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando una columna de intercambio de aniones FAX Hewlett Packard 1090 (HPLC y Gen-Pak<sup>MR</sup>) (Millipore Corp., Milford, Mass.). El gradiente utilizado para purificar el ADN monocatenario se muestra en la Tabla 1, y la temperatura del horno fue de 60°C. La absorbancia se monitoreó a 260 nm. El ADN monocatenario eluido de la HPLC se recogió en fracciones de 0,5 min. Las fracciones que contenían ADN monocatenario fueron precipitadas con etanol, sedimentadas y secadas como se ha descrito anteriormente. Los sedimentos de ADN secos se agruparon en 200 µL de agua estéril.

Tabla 1-Gradiente de HPLC para la purificación de ADN monocatenario

Tiempo (min)	%A	%B	%C	Flujo (mL/min)
0	70	30	0	0,75
2	40	60	0	0,75
17	15	85	0	0,75
18	0	100	0	0,75
23	0	100	0	0,75
24	0	0	100	0,75
28	0	0	100	0,75
29	0	100	0	0,75
34	0	100	0	0,75
35	70	30	0	0,75
Regulador A es Tris 25 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0				
Regulador B es Tris 25 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M, pH 8,0				
Regulador C es ácido fosfórico 40 mM				

El ADN monocatenario fue 5'-fosforilado en preparación para la mutagénesis. Se añadieron 24 µL de regulador 10\* quinasa (United States Biochemical, Cleveland, Ohio), 10,4 µL de adenosina-5'-trifosfato 10 mM (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Ind.) y 2 µL de polinucleótido quinasa (30 unidades/µL, United States Biochemical, Cleveland, Ohio) a cada muestra, y los tubos se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las reacciones se detuvieron incubando los tubos a 70°C durante 10 min. El ADN se purificó con una extracción de fenol equilibrado con Tris (pH> 8,0, United States Biochemical, Cleveland, Ohio) : cloroformo: alcohol isoamílico (50:49:1) y una extracción con cloroformo : alcohol isoamílico (49:1). Después de las extracciones, el ADN se precipitó con etanol y se sedimentó como se ha descrito anteriormente. Los sedimentos de ADN se secaron, después se disolvieron en 50 µL de agua estéril. La concentración se determinó midiendo la absorbancia de una alícuota del ADN a 260 nm usando 33 µg/mL para una absorbancia de 1,0. Las muestras se almacenaron a -20°C.

Preparación de plantillas de uracilo utilizadas en la generación de bibliotecas de fago de anticuerpos de bazo

Se añadió 1 mL de CJ236 de *E. coli* (BioRAD, Hercules, CA) durante la noche a 50 mL de 2\*YT en un matraz de agitación de 250 mL. El cultivo se desarrolló a 37°C hasta OD600 = 0,6, se inoculó con 10 µL de una dilución 1/100 de material de fago vector BS45 (descrito en la patente de Estados Unidos No. 6.555.310) y se continuó el crecimiento durante 6 h. Aproximadamente 40 mL del cultivo se centrifugaron a 12 krpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante (30 mL) se transfirió a un tubo de centrifugación nuevo y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos después de la adición de 15 µL de 10 mg/mL de RNasa A (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Ind.). Los fagos se precipitaron mediante la adición de 7,5 mL de polietilenglicol 8000 al 20% (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)

/ acetato de amonio 3,5 M (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) e incubación en hielo durante 30 minutos. La muestra se centrifugó a 12 krpm durante 15 minutos a 2-8°C. El sobrenadante se descartó cuidadosamente y el tubo se centrifugó brevemente para eliminar todos los restos de sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 400 µL de regulador de alto contenido de sal (NaCl 300 mM, Tris 100 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) y se transfirió a un tubo de 1,5 mL.

El material fago se extrajo repetidamente con un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico equilibrado (50: 49:1) hasta que no quedó rastro de una interfase blanca y después se extrajo con un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1). El ADN se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol y 1/5 de volumen de acetato de amonio 7,5 M y se incubó durante 30 minutos a -20°C. El ADN se centrifugó a 14 krpm durante 10 min a 4°C, el sedimento se lavó una vez con etanol frío al 70% y se secó al vacío. El ADN plantilla de uracilo se disolvió en 30 µL de agua estéril y la concentración se determinó mediante A260 usando una absorbancia de 1,0 para una concentración de 40 µg/mL. La plantilla se diluyó hasta 250 ng/µL con agua estéril, se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C.

Mutagénesis de la plantilla de uracilo con ADNmc y electroporación en *E. coli* para generar bibliotecas de fagos de anticuerpos

Las bibliotecas de despliegue en fagos de anticuerpos se generaron introduciendo simultáneamente genes de cadenas pesadas y ligeras de cadena sencilla sobre una plantilla de uracilo vector de despliegue en fagos. Se realizó una mutagénesis típica en una escala de 2 µg mezclando lo siguiente en un tubo de reacción de PCR de 0,2 mL: 8 µL de plantilla de uracilo (250 ng/µL), 8 µL de regulador de hibridación 10\* (Tris 200 mM, pH 7,0, MgCl<sub>2</sub>, NaCl 500 mM), 3,33 µL de inserto de cadena pesada monocatenaria con transferencia de fosfato (100 ng/µL), 3,1 µL de inserto de cadena ligera de cadena sencilla con transferencia de fosfato (100 ng/µL) y agua estéril hasta 80 µL. El ADN se hibridó en un termociclador GeneAmp® 9600 usando el siguiente perfil térmico: 20 segundos a 94°C, 85°C durante 60 segundos, rampa de 85°C a 55°C durante 30 minutos, mantener a 55°C durante 15 minutos. El ADN se transfirió al hielo después de que terminó el programa. La extensión/ligación se llevó a cabo añadiendo 8 µL de regulador de síntesis 10\* (5 mM cada dNTP, ATP 10 mM, Tris 100 mM, pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, DTT 20 mM), 8 µL de ADN ligasa T4 (1 U/µL, Boehringer Mannheim, Indianápolis, Ind.), 8 µL de ADN polimerasa T7 diluida (1 U/µL, New England BioLabs, Beverly, Mass.) e incubación a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo con 300 µL de regulador de detención de la mutagénesis (Tris 10 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM). El ADN de mutagénesis se extrajo una vez con fenol (pH > 8) : cloroformo : alcohol isoamílico equilibrado (50:49:1), una vez con cloroformo : alcohol isoamílico (49:1) y el ADN se precipitó con etanol a -20°C durante al menos 30 min. El ADN se sedimentó y el sobrenadante se retiró cuidadosamente como se ha descrito anteriormente. La muestra se centrifugó brevemente y se eliminaron todos los restos de etanol con un pipeteador. El sedimento se secó al vacío. El ADN se resuspendió en 4 µL de agua estéril.

Se transfirió 1 µL de ADN de mutagénesis (500 ng) a 40 µL de DH12S de *E. coli* electrocompetente (Gibco/BRL, Gaithersburg, Md.) usando electroporación. Las células transformadas se mezclaron con aproximadamente 1,0 mL de células XL-1 durante la noche que se diluyeron con caldo 2\*YT hasta un 60% del volumen original. Esta mezcla se transfirió a continuación a un tubo de cultivo estéril de 15 mL y se añadieron 9 mL de agar superior para sembrar sobre una placa de agar LB de 150 mm. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C y luego se transfirieron a 20°C durante la noche. Los fagos de anticuerpos de la primera ronda se prepararon eluyendo el fago de estas placas en 10 mL de 2\*YT, centrifugando los residuos y tomando el sobrenadante. Estas muestras son las bibliotecas de despliegue en fagos de anticuerpos usadas para seleccionar anticuerpos contra el BST1. La eficiencia de las electroporaciones se midió sembrando 10 µL de una dilución de 10<sup>-4</sup> células suspendidas en placas de agar LB, seguido de incubación durante la noche de las placas a 37°C. La eficacia se calculó multiplicando el número de colonias en la placa de dilución 10<sup>-4</sup> por 10<sup>6</sup>. Las eficiencias de electroporación de la biblioteca son típicamente mayores que 1\*10<sup>7</sup> fagos en estas condiciones.

Transformación de *E. coli* por electroporación

Las células de *E. coli* electrocompetentes se descongelaron sobre hielo. El ADN se mezcló con 40 L de estas células pipeteando suavemente las células hacia arriba y hacia abajo 2-3 veces, teniendo cuidado de no introducir una burbuja de aire. Las células se transfirieron a una cubeta de Gene Pulser (hueco de 0,2 cm, BioRAD, Hercules, CA) que se había enfriado sobre hielo, nuevamente teniendo cuidado de no introducir una burbuja de aire en la transferencia. La cubeta se colocó en el Pulser de *E. coli* (BioRAD, Hercules, CA) y se sometió a electroporación con el voltaje ajustado en 1,88 kV según la recomendación del fabricante. La muestra transformada se resuspendió inmediatamente en 1 mL de caldo 2\*YT o 1 mL de una mezcla de 400 µL de 2\*YT/600 µL de células XL-1 durante la noche y se procesó de acuerdo con los procedimientos indicados.

Siembra en placa del fago M13 o células transformadas con la reacción de mutagénesis del vector de despliegue en fagos del anticuerpo

Se añadieron muestras de fago a 200 µL de un cultivo durante toda la noche de *E. coli* XL1-Blue cuando se sembraron en placas de agar LB de 100 mm o 600 µL de células durante la noche cuando se sembraron en placas de 150 mm en tubos estériles de cultivo de 15 mL. Después de añadir agar superior LB (3 mL para placas de 100

mm o 9 mL para placas de 150 mm, se almacenó con agar superior a 55°C (véase el apéndice A1, Sambrook et al., citado anteriormente), la mezcla se distribuyó uniformemente en una palca de agar LB que había sido calentada previamente (37°C-55°C) para eliminar el exceso de humedad sobre la superficie del agar. Las placas se enfriaron a temperatura ambiente hasta que el agar superior se solidificó. Las placas se invirtieron y se incubaron a 37°C como se indica.

#### Preparación de ADP-ribosil ciclasa 2 biotinilada y de anticuerpos biotinilados

El antígeno recombinante BST1 concentrado (dominio extracelular de longitud completa) se dializó extensamente en BBS (borato 20 mM, NaCl 150 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,1%, pH 8,0). Después de la diálisis, se hizo reaccionar 1 mg del BST1 (1 mg/mL en BBS) con un exceso molar de 15 veces del éster de biotina-XX-NHS (Molecular Probes, Eugene, Oregón, solución madre a 40 mM en DMSO). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 90 minutos y después se inactivó con taurina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) a una concentración final de 20 mM. La mezcla de reacción de biotinilación se dializó entonces contra BBS a 2-8°C. Después de la diálisis, el BST1 biotinilado se diluyó en regulador de adsorción (Tris 40 mM, NaCl 150 mM, 20 mg/mL de BSA, Tween 20 al 0,1%, pH 7,5), se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C hasta que se necesitaron.

Los anticuerpos se hicieron reaccionar con 3-(N-maleimidilpropionil)-biocitina (Molecular Probes, Eugene, Oregón) usando una cisteína libre situada en el extremo terminal carboxilo de cadena pesada. Los anticuerpos se redujeron añadiendo DTT hasta una concentración final de 1 mM durante 30 min a temperatura ambiente. El anticuerpo reducido se hizo pasar a través de una columna de desalación Sefadex G50 equilibrada en fosfato de potasio 50 mM, ácido bórico 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0. Se añadió 3-(N-maleimidilpropionil)-biocitina hasta una concentración final de 1 mM y se dejó que la reacción prosiguiera a temperatura ambiente durante 60 min. Las muestras se dializaron luego extensamente contra BBS y se almacenaron a 2-8°C.

#### Preparación de látex magnético de avidina

El látex magnético (Estapor, 10% de sólidos, Bangs Laboratories, Fishers, Ind.) se resuspendió completamente y se dividió en alícuotas de 2 mL en un tubo cónico de 15 mL. El látex magnético se suspendió en 12 mL de agua destilada y se separó de la solución durante 10 min usando un imán (PerSeptive Biosystems, Framingham, Mass.). Mientras se mantenía la separación del látex magnético con el imán, se retiró cuidadosamente el líquido usando una pipeta estéril de 10 mL. Este proceso de lavado se repitió tres veces más. Después del lavado final, el látex se resuspendió en 2 mL de agua destilada. En un tubo cónico separado de 50 mL, se disolvieron 10 mg de avidina-HS (NeutrAvidin, Pierce, Rockford, IL) en 18 mL de Tris 40 mM, cloruro sódico 0,15 M, pH 7,5 (TBS). Mientras se agitaba con agitación tipo vórtice, se añadieron los 2 mL de látex magnético lavado a la avidina-HS diluida y se revolvió la mezcla durante 30 segundos más. Esta mezcla se incubó a 45°C durante 2 h, agitando cada 30 min. El látex magnético de avidina se separó de la solución usando un imán y se lavó tres veces con 20 mL de BBS como se describió anteriormente. Después del lavado final, el látex se resuspendió en 10 mL de BBS y se almacenó a 4°C.

Inmediatamente antes del uso, el látex magnético de avidina se equilibró en regulador de adsorción (Tris 40 mM, NaCl 150 mM, 20 mg/mL de BSA, Tween 20 al 0,1%, pH 7,5). El látex magnético de avidina necesario para un experimento de adsorción (200 µL/muestra) se añadió a un tubo de centrifuga estéril de 15 mL y se llevó a 10 mL con regulador de adsorción. El tubo se colocó en el imán durante 10 minutos para separar el látex. La solución se retiró cuidadosamente con una pipeta estéril de 10 mL como se ha descrito anteriormente. El látex magnético se resuspendió en 10 mL de regulador de adsorción para iniciar el segundo lavado. El látex magnético se lavó un total de 3 veces con regulador de adsorción. Después del lavado final, el látex se resuspendió en regulador de adsorción hasta el volumen de partida.

#### Ejemplo 2: Selección de anticuerpos policlonales recombinantes para el antígeno BST1

Los reactivos de unión que se unen específicamente al BST1 se seleccionaron de las bibliotecas de despliegue en fagos creadas a partir de ratones hiperinmunizados como se describe en el Ejemplo 1.

#### 45 Adsorción

Se preparó una primera ronda de fagos de anticuerpos como se describe en el Ejemplo 1 usando una plantilla de uracilo BS45. Se realizaron electroporaciones de ADN de mutagénesis produciendo muestras de fagos derivadas de diferentes ratones inmunizados. Para crear más diversidad en la biblioteca policlonal recombinante, cada muestra de fago se adsorbió por separado.

Antes de la primera ronda de adsorción funcional con el antígeno BST1 biotinilado, se seleccionaron las bibliotecas de fagos de anticuerpos para el fago que mostraba cadenas pesadas y ligeras en su superficie por adsorción con látex magnético 7F11 (como se describe en los Ejemplos 21 y 22 de la patente de Estados Unidos No. 6.555.310). La adsorción funcional de estas bibliotecas enriquecidas se realizó en principio como se describe en el Ejemplo 16 de la patente de Estados Unidos No. 6.555.310. Específicamente, se añadieron 10 µL de antígeno BST1 biotinilado 1\*10<sup>-6</sup> M a las muestras de fago (aproximadamente una concentración final de 1\*10<sup>-8</sup> M de BST1), y se dejó que la mezcla alcanzara el equilibrio durante la noche a 2-8°C.

Después de alcanzar el equilibrio, las muestras se adsorbieron con un látex magnético de avidina para capturar el fago del anticuerpo unido al BST1. El látex magnético de avidina equilibrado (Ejemplo 1), 200  $\mu$ L de látex por muestra, se incubó con el fago durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de 10 min, se añadieron aproximadamente 9 mL de regulador de adsorción a cada muestra de fago, y se separó el látex magnético de la solución usando un imán. Después de una separación de diez minutos, el fago no unido se retiró cuidadosamente usando una pipeta estéril de 10 mL. El látex magnético se resuspendió entonces en 10 mL de regulador de adsorción para comenzar el segundo lavado. El látex se lavó un total de tres veces como se ha descrito anteriormente. Para cada lavado, los tubos estaban en contacto con el imán durante 10 minutos para separar el fago no unido del látex magnético. Después del tercer lavado, el látex magnético se resuspendió en 1 mL de regulador de adsorción y se transfirió a un tubo de 1,5 mL. El volumen entero de látex magnético para cada muestra se recogió luego y se resuspendió en 200  $\mu$ L de 2\*YT y se sembró en placas LB de 150 mm como se describe en el Ejemplo 1 para amplificar el fago unido. Las placas se incubaron a 37°C durante 4 horas, después durante una noche a 20°C.

Las placas de 150 mm utilizadas para amplificar el fago unido se usaron para generar la siguiente ronda de fagos de anticuerpos. Después de la incubación durante la noche, el fago del anticuerpo de la segunda ronda se eluyó de las placas de 150 mm pipeteando 10 mL de medio 2\*YT en el tamiz y agitando suavemente la placa a temperatura ambiente durante 20 min. Las muestras de fago se transfirieron luego a tubos de centrifuga estériles desechables de 15 mL con un tapón de sellado y los residuos de la placa de LB se sedimentaron por centrifugación de los tubos durante 15 min a 3.500 rpm. El sobrenadante que contenía el fago del anticuerpo de la segunda ronda se transfirió entonces a un nuevo tubo.

Se dispuso una segunda ronda de adsorción funcional diluyendo 100  $\mu$ L de cada existencia de fago en 900  $\mu$ L de regulador de adsorción en 15 mL de tubos de centrifugación estériles desechables. A continuación, se añadió el antígeno BST1 biotinilado a cada muestra como se describe para la primera ronda de adsorción, y las muestras de fagos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras de fago se adsorbieron luego con látex magnético de avidina como se ha descrito anteriormente. El progreso de la adsorción se controló en este punto sembrando alícuotas de cada muestra de látex en placas de agar LB de 100 mm para determinar el porcentaje de positivos kappa. La mayoría del látex de cada adsorción (99%) se sembró sobre placas de agar LB de 150 mm para amplificar el fago unido al látex. Las placas de agar LB de 100 mm se incubaron a 37°C durante 6-7 horas, después de lo cual las placas se transfirieron a temperatura ambiente y se colocaron los filtros de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,45 mm, BA85 Protran, Schleicher & Schuell, Keene, NH) sobre las placas.

Las placas con filtros de nitrocelulosa se incubaron durante la noche a temperatura ambiente y luego se desarrollaron con un conjugado de cabra anti-fosfatasa alcalina kappa de ratón para determinar el porcentaje de positivos kappa como se describe a continuación. Las muestras de fago con porcentajes menores (<70%) de positivos kappa en la población se sometieron a una ronda de adsorción con látex magnético 7F11 antes de realizar una tercera ronda funcional de adsorción durante la noche a 2-8°C usando el antígeno BST1 biotinilado a aproximadamente  $2 \times 10^{-9}$  M. Esta ronda de adsorción también se controló para los positivos kappa. Las muestras de fagos individuales que tenían porcentajes positivos kappa mayores del 80% se agruparon y se sometieron a una ronda final de adsorción durante la noche a 2-8°C a  $5 \times 10^{-9}$  M. Los genes de anticuerpo BST1 contenidos dentro del fago eluido de esta cuarta ronda de adsorción funcional se subclonaron en el vector de expresión, pBRncoH3.

El proceso de subclonación se realizó generalmente como se describe en el Ejemplo 18 de la patente de Estados Unidos No. 6.555.310. Después de la subclonación, el vector de expresión se electroporó en células DH10B y la mezcla se desarrolló durante la noche en 2\*YT que contenía 1% de glicerol y 10  $\mu$ g/mL de tetraciclina. Después de una segunda ronda de crecimiento y selección en tetraciclina, se congelaron alícuotas de células a -80°C. como la fuente para la producción de anticuerpos policlonales BST1. Los anticuerpos monoclonales se seleccionaron a partir de estas mezclas policlonales mediante la siembra de la muestra en placas de agar LB que contenían 10  $\mu$ g/mL de tetraciclina y la detección de anticuerpos que reconocieran el BST1.

#### Expresión y purificación de anticuerpos recombinantes contra ADP-ribosil ciclasa 2

Se generó un inóculo en un matraz de agitación durante la noche desde un banco de células a -70°C en un agitador de incubadora Innova 4330 (New Brunswick Scientific, Edison, N.J.) ajustado a 37°C, 300 rpm. El inóculo se usó para sembrar un fermentador de 20 L (Applikon, Foster City, CA) que contenía medio de cultivo definido [Pack et al. (1993) Bio/Technology 11: 1271-1277] suplementado con 3 g/L de L-leucina, 3 g/L de L-isoleucina, 12 g/l de digestión de caseína (Difco, Detroit, Michigan), 12,5 g/L de glicerol y 10  $\mu$ g/mL de tetraciclina. La temperatura, el pH y el oxígeno disuelto en el fermentador se controlaron a 26°C, 6,0-6,8 y 25% de saturación, respectivamente. La espuma se controló mediante la adición de polipropilenglicol (Dow, Midland, Michigan). Se añadió glicerol al fermentador en un modo alimentado por lotes. La expresión de Fab se indujo por adición de L(+)-arabinosa (Sigma, St. Louis, Mo.) a razón de 2 g/L durante la fase tardía de crecimiento logarítmico. La densidad celular se midió por densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro UV-1201 (Shimadzu, Columbia, Md.). Tras la terminación de la operación y el ajuste del pH a 6,0, el cultivo se pasó dos veces a través de un Microfluidizador M-210B-EH (Microfluidics, Newton, Mass.) a 17.000 psi. La homogeneización a alta presión de las células liberó el Fab en el sobrenadante del cultivo.

La primera etapa en la purificación fue cromatografía de afinidad de metal inmovilizado en lecho expandido (EB-

- IMAC). Se cargó la resina quelante Streamline™ (Pharmacia, Piscataway, N.J.) con NiCl<sub>2</sub> 0,1 M y luego se expandió y se equilibró en acetato 50 mM, NaCl 200 mM, imidazol 10 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,01%, regulador de pH 6,0 que fluye en dirección ascendente. Se usó una solución madre para llevar el homogeneizado de cultivo a imidazol 10 mM, después de lo cual se diluyó dos veces o más en regulador de equilibrio para reducir el contenido de sólidos húmedos a menos del 5% en peso. A continuación, se cargó en la columna Streamline que fluía en dirección ascendente a una velocidad superficial de 300 cm/h. Los restos celulares pasaron sin impedimento, pero el Fab se capturó por medio de la interacción de alta afinidad entre níquel y la etiqueta de hexahistidina en la cadena pesada Fab. Después del lavado, el lecho expandido se convirtió en un lecho empacado y el Fab se eluyó con borato 20 mM, NaCl 150 mM, imidazol 200 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,01%, pH 8,0, fluyendo en dirección descendente.
- 10 La segunda etapa en la purificación utilizó cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se equilibró la resina de sefarosa Q FastFlow (Pharmacia, Piscataway, N.J.) en borato 20 mM, NaCl 37,5 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,01%, pH 8,0. La combinación de elución de Fab de la etapa EB-IMAC se diluyó cuatro veces en borato 20 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,01%, pH 8,0 y se cargó en la columna de IEC. Después del lavado, el Fab se eluyó con un gradiente salino de NaCl 37,5-200 mM. Las fracciones de elución se evaluaron para determinar la pureza utilizando un sistema SDS-PAGE Xcell II<sup>MR</sup> (Novex, San Diego, CA) antes de la combinación. Finalmente, se concentró la combinación de Fab y se diafiltró en regulador de borato 20 mM, NaCl 150 mM, NaN<sub>3</sub> al 0,01%, pH 8,0 para almacenamiento. Esto se consiguió en un sistema Sartoclon Slice<sup>MR</sup> equipado con un casete de 10.000 MWCO (Sartorius, Bohemia, N.Y.). Los rendimientos finales de purificación eran típicamente del 50%. La concentración del Fab purificado se midió por absorbancia de UV a 280 nm, asumiendo una absorbancia de 1,6 para una solución de 1 mg/mL.

#### 20 Ejemplo 3: Especificidad de anticuerpos monoclonales para BST1 determinada por análisis de citometría de flujo

- La especificidad de anticuerpos frente al BST1 seleccionada en el Ejemplo 2 se ensayó mediante citometría de flujo. Para probar la capacidad de los anticuerpos para unirse a la proteína BST1 de la superficie celular, los anticuerpos se incubaron con las células que expresan BST1, A549 y H226, de adenocarcinoma de pulmón humano y carcinoma escamoso de pulmón humano, respectivamente. Las células se lavaron en regulador FACS (DPBS, 2% de FBS), se centrifugaron y se resuspendieron en 100 µL del anticuerpo BST1 primario diluido (también diluido en regulador FACS). El complejo de anticuerpo-A549 se incubó sobre hielo durante 60 minutos y después se lavó dos veces con regulador FACS como se ha descrito anteriormente. El sedimento de anticuerpo celular se resuspendió en 100 µL del anticuerpo secundario diluido (también diluido en regulador FACS) y se incubó sobre hielo durante 60 minutos. El sedimento se lavó como antes y se resuspendió en 200 µL de regulador FACS. Las muestras se cargaron en el citómetro de flujo BD FACScanto II y los datos se analizaron utilizando el software BD FACSDiva.

#### Resultados

- Los resultados del análisis de citometría de flujo demostraron que 4 anticuerpos monoclonales designados BST1\_A1, BST1\_A2 y BST1\_A3 se unían eficazmente al BST1 humano de la superficie de la célula. La Figura 3a muestra las especificidades de unión de BST1\_A1 y BST1\_A2 a BST1 en las células A549 y H226, respectivamente. La Figura 3b muestra las especificidades de unión de BST1\_A3 a BST1 en células A549 y H226. Los resultados indican fuerte unión de los anticuerpos contra BST1 en A549 y H226.

#### Ejemplo 4: Caracterización estructural de anticuerpos monoclonales para BST1

- Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales BST1\_A2 y BST1\_A1 se obtuvieron usando técnicas de PCR estándar y se secuenciaron usando técnicas de secuenciación estándar de ADN.

Las secuencias de anticuerpos pueden experimentar mutagénesis para volver a los residuos de la línea germinal en uno o más residuos.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de BST1\_A2 son las SEQ ID NOs: 6 y 2, respectivamente.

- 45 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de BST1\_A2 son las SEQ ID NOs: 8 y 4, respectivamente.

- La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada BST1\_A2 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal murina conocidas demostró que la cadena pesada de BST1\_A2 utiliza un segmento de V<sub>H</sub> de la línea germinal 1-39 de V<sub>H</sub> murina. El análisis posterior de la secuencia de V<sub>H</sub> de BST1\_A2 utilizando el sistema Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en las SEQ ID NOs: 22, 24 y 26, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias de V<sub>H</sub> de CDR1 y CDR2 de BST1\_A2 con la secuencia 1-39 de V<sub>H</sub> de línea germinal se muestran en las Figuras 1a y 1b.

- 55 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de BST1\_A2 con las secuencias conocidas de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal murina demostró que la cadena ligera de BST1\_A2 utiliza un segmento de V<sub>K</sub> de la línea germinal 4-55 de V<sub>K</sub> murina. Un análisis adicional de la secuencia de V<sub>K</sub> de BST1\_A2

utilizando el sistema de Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en las SEQ ID NOs: 28, 30 y 32, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias de  $V_K$  de CDR1, CDR2 y CDR3 de BST1\_A2 con las secuencias 4-55 de  $V_K$  de la línea germinal se muestran en las Figuras 2a, 2b y 2c.

5 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de BST1\_A1 son las SEQ ID NOs: 5 y 1, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de BST1\_A1 son las SEQ ID NOs: 7 y 3, respectivamente.

10 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de BST1\_A1 con las secuencias conocidas de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal murina demostró que la cadena pesada de BST1\_A1 utiliza un segmento de  $V_H$  de la línea germinal 1-80 de  $V_H$  murina. El análisis adicional de la secuencia de  $V_H$  de BHT1\_A1 utilizando el sistema de Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en las SEQ ID NOs: 21, 23 y 25, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias de  $V_H$  de CDR1 y CDR2 de BST1\_A1 con la secuencia 1-80 de  $V_H$  de la línea germinal se muestran en la Figura 1a y 1b.

15 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de BST1\_A1 con las secuencias conocidas de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal murina demostró que la cadena ligera de BST1\_A1 utiliza un segmento de 4-74 de  $V_K$  de la línea germinal. Un análisis adicional de la secuencia de  $V_K$  de BK1\_A1 usando el sistema de Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en las SEQ ID NOs: 27, 29 y 31, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias de  $V_K$  de CDR1, CDR2 y CDR3 de BST1\_A1 con las secuencias 4-74 de  $V_K$  de la línea germinal se muestran en las Figuras 2a, 2b y 2c.

20 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena pesada de BST1\_A3 son las SEQ ID NOs: 54 y 52, respectivamente.

25 Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de cadena ligera de BST1\_A3 son las SEQ ID NOs: 55 y 53, respectivamente.

30 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de BST1\_A3 con las secuencias conocidas de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal murina demostró que la cadena pesada de BST1\_A3 utiliza un segmento de  $V_H$  de la secuencia 69-1 de línea germinal murina. El análisis adicional de la secuencia de  $V_H$  de BHT1\_A3 utilizando el sistema de Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se muestra en las SEQ ID NOs: 62, 63 y 64, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias de  $V_H$  de CDR1 y CDR2 de BST1\_A3 con la secuencia 69-1 de  $V_H$  de línea germinal murina se muestran en las Figuras 1a y 1b.

35 La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de BST1\_A3 con las secuencias conocidas de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal murina demostró que la cadena ligera de BST1\_A3 utiliza un segmento de  $V_K$  de la secuencia 44-1 de línea germinal murina. Un análisis adicional de la secuencia de  $V_K$  de BKT1\_A3 utilizando el sistema de Kabat de determinación de la región CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera como se muestra en las SEQ ID NO: 65, 66 y 67, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias de  $V_K$  de CDR1, CDR2 y CDR3 de BST1\_A3 con las secuencias 44-1 de línea germinal de  $V_K$  murinas se muestran en las Figuras 2a, 2b y 2c.

40 Ejemplo 5: Internalización y MabZAP de BST1\_A1 y BST1\_A2 en células A549 y H226.

La internalización de BST1\_A1 y BST1\_A2 por H226 y A549 se investigó usando un ensayo de MabZap. El ensayo de MabZAP mostró internalización de los anticuerpos monoclonales anti-BST1 mediante la unión de un anticuerpo secundario anti-IgG humano conjugado con la toxina saporina. (Advanced Targeting System, San Diego, CA, IT-22-100). En primer lugar, se unió Fab de BST1 a la superficie de las células. A continuación, los anticuerpos MabZAP se unieron a los anticuerpos primarios. A continuación, el complejo MabZAP fue internalizado por las células. La entrada de Saporina en las células dio como resultado la inhibición de la síntesis de proteínas y la muerte celular eventual.

50 El ensayo de MabZAP se llevó a cabo como sigue. Cada una de las células se sembró a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por pozo. El anticuerpo monoclonal anti-BST1 o una IgG humana de control de isotipo se diluyó en serie, después se añadió a las células y se incubó durante 15 minutos a 25°C. Después se añadió el MabZAP y se incubó durante 72 horas a 37°C. La viabilidad celular en las placas se detectó mediante el kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega, G7571) y las placas se leyeron y analizaron usando Promega Glomax. La muerte celular fue proporcional a la concentración de anticuerpos monoclonales anti-BST1. Las Figuras 4a y 4b muestran que los anticuerpos monoclonales anti-BST1, BST1\_A1 y BST1\_A2 fueron interiorizados eficientemente por las células H226 y A549, en comparación con el anticuerpo de control de isotipo anti-IgG humano.

Ejemplo 6: Humanización de BST1\_A2

Para diseñar secuencias humanizadas de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de BST1\_A2, se identificaron los aminoácidos del marco importantes para la formación de la estructura de CDR usando el modelo tridimensional. Las secuencias de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> humanas con homología alta con BST1\_A2 también se seleccionaron de la base de datos del GenBank. Las secuencias de CDR junto con los residuos identificados de aminoácidos del marco se injertaron a partir de BST1\_A2 a las secuencias humanas del marco (Figuras 5-7).

Ejemplo 7: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por mAb anti-BST1

En primer lugar, se añadieron 25 µL de anticuerpos anti-BST1 parentales y no fucosilados (BST1\_A2 y BST1\_A2\_NF) a concentraciones que oscilaban entre 10 nm/L y 0,1 nm/L a pozos separados de una placa de 96 pozos de fondo en v junto con 50 µL de células A549 y U937 que expresan BST1. Después se añadieron 25 µL de células efectoras a los pozos para producir una relación final efector:objetivo (E:T) de 10:1 y 25:1. A continuación, la placa se centrifugó suavemente a 1.000 rpm durante 2 minutos, después de lo cual se incubó durante 4 horas a 37°C, en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5%. A las 3 h después de la incubación, se añadieron 10 µL de solución de lisis a cada uno de los pozos que contenían células solas que expresan BST1 para medir la liberación máxima de LDH, y un conjunto de pozos que contenía solo medio para el control de la corrección de volumen.

Después de la incubación, las células se centrifugaron suavemente a 1.000 rpm durante 2 minutos, después de lo cual se transfirieron 50 µL de sobrenadante a una placa de 96 pozos de fondo plano. Utilizando el ensayo de citotoxicidad no radioactivo CytoTox 96® disponible a través de Promega (Cat. #: G1780), se reconstituyeron los componentes del kit de acuerdo con las especificaciones del fabricante y luego se añadieron 50 µL de la mezcla de sustrato a cada pozo. La placa se recubrió entonces y se dejó incubar durante 30 minutos a 25°C protegido de la luz. Después de esto, se añadieron 50 µL de solución de detención a cada pozo y se registró la absorbancia a 490 nm utilizando el lector de placas variokan.

Usando un anticuerpo conocido por inducir la muerte celular a través de ADCC como control positivo y un control de isotipo IgG1 humano como control negativo, los resultados muestran que BST1\_A2 y BST1\_A2\_NF eran capaces de provocar ADCC en células A549 y U937 que expresan BST1. En las células A549 que expresan BST1, BST1\_A2\_NF se mostró que aproximadamente 45% mueren con 10 nmol/L (Figura 8a). En las células U937 que expresan BST1, BST1\_A2 se mostró que aproximadamente el 20% mueren con 1 nmol/L y BST1\_A2\_NF mostraron que aproximadamente 45% mueren con 1 nmol/L (Figura 8b).

Ejemplo 8: Especificidad de anticuerpos monoclonales para BST1 determinada por análisis de citometría de flujo en pacientes con LMA

La capacidad de BST\_A2 de unirse a linfoblastos de pacientes con LMA se ensayó mediante Análisis de Citometría de Flujo. Se tomó sangre de 20 pacientes con LMA. Usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 3, se demostró que BST\_A2 se unía a blastocitos de LMA de aprox. 80% de los pacientes con LMA.

Listado de secuencias

SEQ ID No	Descripción	Secuencia
1	aa H_A1	MKQSTIALALLPLLFPTVAKAQVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSNSWINWV KQRPGQGLEWIGQIYPGDYDTNNGKFKGKATLTADYSSSTAYMQLNSLTSEDSAVY FCARGGSIYYGNLGFDFVWAGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCL VKGYPFPEPVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVA HPASSTKVDKIVPRDCHHHHHHH
2	aaV <sub>H</sub> _A2	MKQSTIALALLPLLFPTVAKAQAYLQQSGPELVKAGASVKMSCKASGYSFIEYTINWVK QSHGKSLEWIGNIDPYYGTTYNQMFMTGKATLTVDQSSNTAYMQLKSLTSEDSAVYF CARGSAWFPYWGQGLTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYPFPE PVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTK VDKIVPRDCHHHHHHH

# ES 2 640 960 T3

3	aa V <sub>K</sub> _A1	<p>MKYLPTAAAGLLLLAAQPAMAEMVLTQSPAIMSTSLGERVTMTCTASSRVSSSYLH  WYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYCHQY  HRSPYTFGGGKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKI  DGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSPIVK  SFNRNES</p> <p>MKYLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMSQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVTYMYWY  QQKPGSSPRLLIYDTSNLASGVVRFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDTATYCCQWSN  YPLTFGAGTKLELKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDG  SERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSPIVKSF  NRNES</p>
4	aa V <sub>K</sub> _A2	<p>acgcttgatcatggagaaaaaaagtgaacaaagcactattgcactggcactctaccgctctattaccctgtggca  aaagcccagggtgaagcttcagcagctccggggctgagctggtaggctggctcctcagtagaagattcctgcaaggctt  ctggctacgcattcagtaactcctggataaactgggtgaagcagaggcctggacagggcttgatggattggacagatt  tacctggagattatgataactacaatgaaaattcaagggtaaagccacactgactgcagactactcctccagcac  agcctacatgcagctcaacagcctaactctgaggaactctgcggctctattctgtcaaggggggatcgtactatctggt  aacctgggttctctgatgctggggcgcaggaccagctaccgtctcctcagccaaacgacacccccatctgctta  tccactggccctggatctgctcccaactaactcctatggtgaccctgggatgctggctcaagggctattccctgagcc  agtgcagtgactggaactctggatccctgtccaggggtgacacactccagctgctcagcagctgactctacact  ctgagcagctcagtgactgtccctccagcactggcccagcagagaccgtcactgcaacgtggccacccggccagc  agcaccaggtggacaagaaaaattgtcccagggttgatcatcatcaccatcaccatcactaattgacagcttatcatcg  atangct</p> <p>aaaaccctgggttaccacgcttgatcatggagaaaaaaagtgaacaaagcactattgcactggcactctaccgc  tctattaccctgtggcaaaagcccaggcttatctacagcagctggacctgagctggtagaggctggcgtcagtgaa  gatgctcgaagcttctggttactcattcattgagtaaccataaaactgggtgaaacagagccatggaagagccttga  gtgattggaatattgatccttattatggaaccactattacaatcagatgltcacgggcaagggccacattgactgtagacc  aatctccaactgcctacatgcagctcaagagcctgacatctgaggactctgcagictattctgtcaagaggctccgc  ctggttcttactggggcaggggactctagtactgctctgcagccaaacgacacccccatctgctatcactggcc  cctggatctgctcccaactaactcctatggtgaccctgggatgctggctcaagggctattccctgagccagtgacagtg  acctggaactctggatccctgtccagcgggtgacacactccagctgctcagctgactctacactctgagcagct  cagtgactgtccctccagcactggcccagcagagaccgtcactgcaacgtggccacccggccagcagcaccag  gtggacaagaaaaattgtcccagggttgatcatcatcaccatcaccatcactaattgacagcttatcatcgat</p> <p>gtttttggatggagtgaacgatgaaatcctattgcctacggcagccgctggattgttattactcgtgctcccaaccagcc  atggccgaaatggttctaccagctcagcaatcatgtctacatcttaggggaacgggtcaccatgacctgactgcc  agctcagtgtaagttcaggtaactgactgactgtaccagcagaagccaggatcctcccaactctggattataglacat  ccaaccctggctctggagctccagctcgtcagtgagcagtggtgctgggaccttactctctcaaatcagcagcatgga  ggctgaagatgctgccatttactgccaccagatcatcgttccccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaa  taaaacgggctgatgctgaccaactgtatcctctccaccatccagtgagcagttacaactctggaggtgcctcagctg  tgtctctgaacaactctaccccaagacatcaatgtcaagtgaagattgatggcagtgaaacgacaaaaatggcgtc  ctgaacagttggactgatcaggacagcaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggagc  agtatgaacgacataacagctatcctgtgaggccactcacaagacatcaactcaccattgtcaagagctcaacag  gaatgagcttaagtattagctaatctagaacg</p>
5	nt V <sub>H</sub> _A1	<p>acgcttgatcatggagaaaaaaagtgaacaaagcactattgcactggcactctaccgctctattaccctgtggca  aaagcccagggtgaagcttcagcagctccggggctgagctggtaggctggctcctcagtagaagattcctgcaaggctt  ctggctacgcattcagtaactcctggataaactgggtgaagcagaggcctggacagggcttgatggattggacagatt  tacctggagattatgataactacaatgaaaattcaagggtaaagccacactgactgcagactactcctccagcac  agcctacatgcagctcaacagcctaactctgaggaactctgcggctctattctgtcaaggggggatcgtactatctggt  aacctgggttctctgatgctggggcgcaggaccagctaccgtctcctcagccaaacgacacccccatctgctta  tccactggccctggatctgctcccaactaactcctatggtgaccctgggatgctggctcaagggctattccctgagcc  agtgcagtgactggaactctggatccctgtccaggggtgacacactccagctgctcagcagctgactctacact  ctgagcagctcagtgactgtccctccagcactggcccagcagagaccgtcactgcaacgtggccacccggccagc  agcaccaggtggacaagaaaaattgtcccagggttgatcatcatcaccatcaccatcactaattgacagcttatcatcg  atangct</p> <p>aaaaccctgggttaccacgcttgatcatggagaaaaaaagtgaacaaagcactattgcactggcactctaccgc  tctattaccctgtggcaaaagcccaggcttatctacagcagctggacctgagctggtagaggctggcgtcagtgaa  gatgctcgaagcttctggttactcattcattgagtaaccataaaactgggtgaaacagagccatggaagagccttga  gtgattggaatattgatccttattatggaaccactattacaatcagatgltcacgggcaagggccacattgactgtagacc  aatctccaactgcctacatgcagctcaagagcctgacatctgaggactctgcagictattctgtcaagaggctccgc  ctggttcttactggggcaggggactctagtactgctctgcagccaaacgacacccccatctgctatcactggcc  cctggatctgctcccaactaactcctatggtgaccctgggatgctggctcaagggctattccctgagccagtgacagtg  acctggaactctggatccctgtccagcgggtgacacactccagctgctcagctgactctacactctgagcagct  cagtgactgtccctccagcactggcccagcagagaccgtcactgcaacgtggccacccggccagcagcaccag  gtggacaagaaaaattgtcccagggttgatcatcatcaccatcaccatcactaattgacagcttatcatcgat</p> <p>gtttttggatggagtgaacgatgaaatcctattgcctacggcagccgctggattgttattactcgtgctcccaaccagcc  atggccgaaatggttctaccagctcagcaatcatgtctacatcttaggggaacgggtcaccatgacctgactgcc  agctcagtgtaagttcaggtaactgactgactgtaccagcagaagccaggatcctcccaactctggattataglacat  ccaaccctggctctggagctccagctcgtcagtgagcagtggtgctgggaccttactctctcaaatcagcagcatgga  ggctgaagatgctgccatttactgccaccagatcatcgttccccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaa  taaaacgggctgatgctgaccaactgtatcctctccaccatccagtgagcagttacaactctggaggtgcctcagctg  tgtctctgaacaactctaccccaagacatcaatgtcaagtgaagattgatggcagtgaaacgacaaaaatggcgtc  ctgaacagttggactgatcaggacagcaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggagc  agtatgaacgacataacagctatcctgtgaggccactcacaagacatcaactcaccattgtcaagagctcaacag  gaatgagcttaagtattagctaatctagaacg</p>
6	nt V <sub>H</sub> _A2	<p>acgcttgatcatggagaaaaaaagtgaacaaagcactattgcactggcactctaccgctctattaccctgtggca  aaagcccagggtgaagcttcagcagctccggggctgagctggtaggctggctcctcagtagaagattcctgcaaggctt  ctggctacgcattcagtaactcctggataaactgggtgaagcagaggcctggacagggcttgatggattggacagatt  tacctggagattatgataactacaatgaaaattcaagggtaaagccacactgactgcagactactcctccagcac  agcctacatgcagctcaacagcctaactctgaggaactctgcggctctattctgtcaaggggggatcgtactatctggt  aacctgggttctctgatgctggggcgcaggaccagctaccgtctcctcagccaaacgacacccccatctgctta  tccactggccctggatctgctcccaactaactcctatggtgaccctgggatgctggctcaagggctattccctgagcc  agtgcagtgactggaactctggatccctgtccaggggtgacacactccagctgctcagctgactctacactctgagcagct  ctgagcagctcagtgactgtccctccagcactggcccagcagagaccgtcactgcaacgtggccacccggccagc  agcaccaggtggacaagaaaaattgtcccagggttgatcatcatcaccatcaccatcactaattgacagcttatcatcg  atangct</p> <p>aaaaccctgggttaccacgcttgatcatggagaaaaaaagtgaacaaagcactattgcactggcactctaccgc  tctattaccctgtggcaaaagcccaggcttatctacagcagctggacctgagctggtagaggctggcgtcagtgaa  gatgctcgaagcttctggttactcattcattgagtaaccataaaactgggtgaaacagagccatggaagagccttga  gtgattggaatattgatccttattatggaaccactattacaatcagatgltcacgggcaagggccacattgactgtagacc  aatctccaactgcctacatgcagctcaagagcctgacatctgaggactctgcagictattctgtcaagaggctccgc  ctggttcttactggggcaggggactctagtactgctctgcagccaaacgacacccccatctgctatcactggcc  cctggatctgctcccaactaactcctatggtgaccctgggatgctggctcaagggctattccctgagccagtgacagtg  acctggaactctggatccctgtccagcgggtgacacactccagctgctcagctgactctacactctgagcagct  cagtgactgtccctccagcactggcccagcagagaccgtcactgcaacgtggccacccggccagcagcaccag  gtggacaagaaaaattgtcccagggttgatcatcatcaccatcaccatcactaattgacagcttatcatcgat</p> <p>gtttttggatggagtgaacgatgaaatcctattgcctacggcagccgctggattgttattactcgtgctcccaaccagcc  atggccgaaatggttctaccagctcagcaatcatgtctacatcttaggggaacgggtcaccatgacctgactgcc  agctcagtgtaagttcaggtaactgactgactgtaccagcagaagccaggatcctcccaactctggattataglacat  ccaaccctggctctggagctccagctcgtcagtgagcagtggtgctgggaccttactctctcaaatcagcagcatgga  ggctgaagatgctgccatttactgccaccagatcatcgttccccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaa  taaaacgggctgatgctgaccaactgtatcctctccaccatccagtgagcagttacaactctggaggtgcctcagctg  tgtctctgaacaactctaccccaagacatcaatgtcaagtgaagattgatggcagtgaaacgacaaaaatggcgtc  ctgaacagttggactgatcaggacagcaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggagc  agtatgaacgacataacagctatcctgtgaggccactcacaagacatcaactcaccattgtcaagagctcaacag  gaatgagcttaagtattagctaatctagaacg</p>
7	nt V <sub>K</sub> _A1	<p>acgcttgatcatggagaaaaaaagtgaacaaagcactattgcactggcactctaccgctctattaccctgtggca  aaagcccagggtgaagcttcagcagctccggggctgagctggtaggctggctcctcagtagaagattcctgcaaggctt  ctggctacgcattcagtaactcctggataaactgggtgaagcagaggcctggacagggcttgatggattggacagatt  tacctggagattatgataactacaatgaaaattcaagggtaaagccacactgactgcagactactcctccagcac  agcctacatgcagctcaacagcctaactctgaggaactctgcggctctattctgtcaaggggggatcgtactatctggt  aacctgggttctctgatgctggggcgcaggaccagctaccgtctcctcagccaaacgacacccccatctgctta  tccactggccctggatctgctcccaactaactcctatggtgaccctgggatgctggctcaagggctattccctgagcc  agtgcagtgactggaactctggatccctgtccaggggtgacacactccagctgctcagctgactctacactctgagcagct  ctgagcagctcagtgactgtccctccagcactggcccagcagagaccgtcactgcaacgtggccacccggccagc  agcaccaggtggacaagaaaaattgtcccagggttgatcatcatcaccatcaccatcactaattgacagcttatcatcg  atangct</p> <p>aaaaccctgggttaccacgcttgatcatggagaaaaaaagtgaacaaagcactattgcactggcactctaccgc  tctattaccctgtggcaaaagcccaggcttatctacagcagctggacctgagctggtagaggctggcgtcagtgaa  gatgctcgaagcttctggttactcattcattgagtaaccataaaactgggtgaaacagagccatggaagagccttga  gtgattggaatattgatccttattatggaaccactattacaatcagatgltcacgggcaagggccacattgactgtagacc  aatctccaactgcctacatgcagctcaagagcctgacatctgaggactctgcagictattctgtcaagaggctccgc  ctggttcttactggggcaggggactctagtactgctctgcagccaaacgacacccccatctgctatcactggcc  cctggatctgctcccaactaactcctatggtgaccctgggatgctggctcaagggctattccctgagccagtgacagtg  acctggaactctggatccctgtccagcgggtgacacactccagctgctcagctgactctacactctgagcagct  cagtgactgtccctccagcactggcccagcagagaccgtcactgcaacgtggccacccggccagcagcaccag  gtggacaagaaaaattgtcccagggttgatcatcatcaccatcaccatcactaattgacagcttatcatcgat</p> <p>gtttttggatggagtgaacgatgaaatcctattgcctacggcagccgctggattgttattactcgtgctcccaaccagcc  atggccgaaatggttctaccagctcagcaatcatgtctacatcttaggggaacgggtcaccatgacctgactgcc  agctcagtgtaagttcaggtaactgactgactgtaccagcagaagccaggatcctcccaactctggattataglacat  ccaaccctggctctggagctccagctcgtcagtgagcagtggtgctgggaccttactctctcaaatcagcagcatgga  ggctgaagatgctgccatttactgccaccagatcatcgttccccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaa  taaaacgggctgatgctgaccaactgtatcctctccaccatccagtgagcagttacaactctggaggtgcctcagctg  tgtctctgaacaactctaccccaagacatcaatgtcaagtgaagattgatggcagtgaaacgacaaaaatggcgtc  ctgaacagttggactgatcaggacagcaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggagc  agtatgaacgacataacagctatcctgtgaggccactcacaagacatcaactcaccattgtcaagagctcaacag  gaatgagcttaagtattagctaatctagaacg</p>

# ES 2 640 960 T3

8	nt V <sub>K</sub> _A2	actctctactgtttccataccggtttttggatggagtgaaacgatgaaatcctattgcctacggcagccgctggattgta ttactcgtgcccaaccagccatggccgacatcgttatgctcagctccagcaatcgtctcgcacatccaggggagaag gtcaccatgacctgcagtgccagctcaagtgaactacatgtactggtaccagcagaagccaggatcctccccagact cctgattatgacacatccaacctggctctggagtcctgcttcgcttcagtggaagtggtctgggaccttactctcaca atcagccgaatggaggctgaagatactgccacttattctgccagcagtggaatattaccactcagcttcggctggg accaagctggagctgaaacgggctgatgctgcaccaactgtatccatctccaccatccagtgagcagttaacatctgg aggcctcagctgctgtcttgaacaactctaccccaaagacatcaatgtcaagtgaagattgatggcagtgaaacg acaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaagacagcacctacagcatgagcagcacccctcacg tgaccaaggacgagtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaactcacccttgtaa gagctcaacaggaatgagcttaagtattgctaatctagaacgcgctactggcactggccctgcttta
9	aa V <sub>H</sub> _CDR1_A1	GYAFSNSWINW
10	aa V <sub>H</sub> _CDR1_A2	GYSFIEYTINW
11	aa V <sub>H</sub> _CDR2_A1	GQIYPGDYDTNYNGKFK
12	aa V <sub>H</sub> _CDR2_A2	GNIDPYYGTTYNQMF
13	aa V <sub>H</sub> _CDR3_A1	ARGGSIYYGNLGFDDV
14	aa V <sub>H</sub> _CDR3_A2	ARGSAWFPY
15	aa V <sub>K</sub> _CDR1_A1	TASSRVSSSYLH
16	aa V <sub>K</sub> _CDR1_A2	SASSSVTYMY
17	aa V <sub>K</sub> _CDR2_A1	STSNLAS
18	aa V <sub>K</sub> _CDR2_A2	DTSNLAS
19	aa V <sub>K</sub> _CDR3_A1	HQYHRSPYT
20	aa V <sub>K</sub> _CDR3_A2	QQWSNYPLT
21	nt V <sub>H</sub> _CDR1_A1	ggctacgcattcagtaactcctggataaactgg
22	nt V <sub>H</sub> _CDR1_A2	ggttactcattcattgagtacaccataaactgg
23	nt V <sub>H</sub> _CDR2_A1	ggacagattatcctggagattatgataactacaatggaaaattcaag
24	nt V <sub>H</sub> _CDR2_A2	ggaaatattgatccttattatggaaccacttattacaatcagatgttcacg
25	nt V <sub>H</sub> _CDR3_A1	gcaaggggggatcgatctactatggaacctcgggttcttcgatgctc
26	nt V <sub>H</sub> _CDR3_A2	gcaagaggctccgctggttcttac
27	nt V <sub>K</sub> _CDR1_A1	actgccagctcacgtgaagtccagttacttgcac
28	nt V <sub>K</sub> _CDR1_A2	agtgccagctcaagtgaactacatgtac
29	nt V <sub>K</sub> _CDR2_A1	agtacatccaacctggctct
30	nt V <sub>K</sub> _CDR2_A2	gacacatccaacctggctct
31	nt V <sub>K</sub> _CDR3_A1	caccagtatcatcgttccccgtacacg
32	nt V <sub>K</sub> _CDR3_A2	cagcagtggaatattaccactcacg
	IGHV1-80*01	
33	(GenBank: AC160990 Musmus)	ggctacgcattcagtagctactggatgaactgg

## ES 2 640 960 T3

- nt 138392-138424  
IGHV1-80\*01
- 34 (GenBank: ggacagattatcctggagatggtgataactactacaacggaaagtcaag  
AC160990 Musmus)  
nt 138461-138511  
IGHV1-39\*01
- 35 (GenBank: ggttactcattcactgactacaacatgaactgg  
AC079181 Musmus)  
nt 153362-153394  
IGHV1-39\*01
- 36 (GenBank: ggagtaattaatcctaactatggtactactagctacaatcagaagtcaag  
AC079181 Musmus)  
nt 153431-153481  
IGKV4-74\*01
- 37 (GenBank: actgccagctcaagtgaagtccagttactgcac  
AJ231217 Musmus)  
nt 496-531  
IGKV4-74\*01
- 38 (GenBank: agcacatccaacctggcttct  
AJ231217 Musmus)  
nt 577-597  
IGKV4-74\*01
- 39 (GenBank: caccagtatcatcgtccccacca  
AJ231217 Musmus)  
nt 691-718  
IGKV4-55\*01
- 40 (GenBank: agtgccagctcaagtgaagttacatgtac  
AJ231225 Musmus)  
nt 523-552  
IGKV4-55\*01
- 41 (GenBank: gacacatccaacctggcttct  
AJ231225 Musmus)  
nt 598-618  
IGKV4-55\*01
- 42 (GenBank: cagcagtgtagtaccaccca  
AJ231225 Musmus)

ES 2 640 960 T3

	nt 715-739	
43	ADP-ribosil ciclasa 2 (CD157; BST1)	MAAQGCAASRLLQLLLQLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDIFLGRCAEYRALL SPEQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPSDYDLFINLSRHSIPRDKSLFWENSHLLV NSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDGLDYQSCPTSEDCENNPVDSF WKRASIYQSKDSSGVIVMLNGSEPTGAYPIKGFADYEIPNLQKEKITRIEIVWMHEIG GPNVESCCEGSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAA ATQRKAPSLYTEQRAGLIPLFLVLASRTQL
44	aa 29-292 of ADP- ribosil ciclasa 2 (CD157; BST1)	GARARWRGEGTSAHLRDIFLGRCAEYRALLSPEQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSV LPSDYDLFINLSRHSIPRDKSLFWENSHLLVNSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSW CRQKNDGLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIYQSKDSSGVIVMLNGSEPTGA YPIKGFADYEIPNLQKEKITRIEIVWMHEIGGPNVESCCEGSMKVLEKRLKDMGFQYS CINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRK
45	A2 V <sub>H</sub> (amino acids 21-137 SEQ ID No: 2)	QAYLQQSGPELVKAGASVKMSCKASGYSFIEYTINWVKQSHGKSLEWIGNIDPYYGT TYYNQMFTGKATLTVDQSSNTAYMQLKSLTSEDSAVYFCARGSAWFPYWGQGLTVT VSA
46	V <sub>H</sub> _1-V <sub>H</sub> _A2 humanizado	QVQLVQSGA EVKKGASVK VSCKASGYSF IEYTINWVRQ APGQGLEWIGNIDPYYGTTY NQMFTGRATL TVDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCARGSAWF PYWGQGLTV TVSS
47	BF238102 V <sub>H</sub>	QVQLVQSGA EVKKGASVK VSCKASGYSF TXXXXXWVRQ APGQGLEWVG XXXXXXXXXXXX XXXXXRVTL TRDTSISTAY MELSRLRSDDTAVYYCARXXXXX XXXWGQGLTV PVSS
48	A2 V <sub>L</sub> (aminoácidos 22-128 SEQ ID No. 4)	DIVMSQSPA IMSASPGEKV TMTCSAS-SS VTMYWYQQKPGSSPRLLIY DTSNLAGVPS VRFSGSGSGT SYSLTISRMEAEDTATYYCQ QWSNYPLTFG AGTKLELK
49	V <sub>L</sub> _1-V <sub>K</sub> _A2 humanizado	DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCSAS-SS VTMYWYQQKPGKAPKLLIY DTSNLAGVPS SRFSGSGSGT DYTLTISSLQPEDFATYYCQ QWSNYPLTFG QGTKVEIK
50	X72441 V <sub>L</sub>	DIQMTQSPS SLSASVGDRV TITCXXXXXX XXXXXWYQQKPGKAPKLLIY XXXXXXXXGVP SRFSGSGSGT DFTLTISSLQPEDFATYYCX XXXXXXXXFG QGTKVEIK
51	V <sub>H</sub> 1_CDR2	NIDPYYGTTYYNQMFQ
52	aa V <sub>H</sub> _A3	MKQSTIALALLPLFTPVAKAQVQLQQSRAELVMPGASVKMSCKTSGYTFSDYVWHW VRQRPGQGLEWIGRIDGSDTFNDYSQKFKGRATLTVDESSSTVYMQLSLTSSEDSAV YYCARGLLQYWGQGTTLTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTGCLVKGYFP EPVTVTWNISGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWVSETVTCNVAHPASST KVDKIVPRDCHHHHHHHH
53	aa V <sub>K</sub> _A3	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIQLTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQ QKQKSPQLLYNTKTLGEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYCQHHYGT PFTFGSGTKLEIKRADAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGS ERQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN RNES

ES 2 640 960 T3

		gtgaaacaaagcactattgcactggcactcttaccgctcttaccctgtggcaaaagcccagggtccagctgcagcag tctagggctgaacttgatgcctgggctcagtgaaatgcctgcaagactctggctacacattctctgactactgggt acactgggtgagcagagcctggacaaggccttgatggatcggagcgatgatggttctgatactttaaactactaca gtcagaaglttaagggcaggccacattgactgtagacgaatcctcagcacagctlacaigcaactcagcagcctgac atctgaggactctgcgctctattactgtgcaagggggccttctcagactggggccaaggcaccactctcacagtctc ctcagccaaaacgacacccccatctgtctatccactggccctggatctgctgccaaaactaactccatggtagccctgg gatgcctgtcaagggctatttccctgagccagtgcagtgacctggaactctggatccctgtccagcgggtgacacact tcccagctgtcctgagctgacctctacactctgagcagctcagtgactgctccctccagcacctggccagcagacc gtcactgcaacgttcccaccggccagcagcacaagggtggacaagaaaattgtcccagggtatgcatcatcac catcacatcactaa
54	nt V <sub>H</sub> _A3	
		atgaaatacctattgacctcggcagccgctggattgtattactcgtgcccaccagccatggccgacattcagctgacc cagctccagcctccctatctgcatctgtgggagaaactgtcacatcacatgctgagcaagtgaaaacattacagtattt agcatggtatcagcagaacaaggaaaatctcctcagctcctggtctataatacaaaaaccttaggagaagggtgcca tcaaggtcagtgagtgatcggcacaacaatttctctgaagatcaacagcctgcagcctgaagatgggaggtatt actgtcaacatcattatggtactccattcagctcggctcgggacaagttggaaataaacgggctgatgctgacca actgtatccatctcccaccatccagtgagcagtaaacatctggaggtgcctcagctgctgtcttgaacaacttcccc aaagacatcaatgtcaagtgaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggac agcaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcacgttgaccaaggacgagatgaacgcataaacagctata cctgtgaggccactcacaagacatcaactcaccattgtcaagagcttcaacaggaatgagcttaa
55	nt V <sub>K</sub> _A3	
56	aa V <sub>H</sub> _CDR1_A3	GYTFSDYWV <sub>H</sub> W
57	aa V <sub>H</sub> _CDR2_A3	GAIDGSDTFNDYSQKFK
58	aa V <sub>H</sub> _CDR3_A3	ARGLLQY
59	aa V <sub>K</sub> _CDR1_A3	RASENIYSYLA
60	aa V <sub>K</sub> _CDR2_A3	NTKTLGE
61	aa V <sub>K</sub> _CDR3_A3	QHHYGTPFT
62	nt V <sub>H</sub> _CDR1_A3	ggctacacattctctgactactgggtacactgg
63	nt V <sub>H</sub> _CDR2_A3	ggagcgatgatggttctgatactttaaactactacagtcagaagtttaag
64	nt V <sub>H</sub> _CDR3_A3	gcaagggggggccttctcagtac
65	nt V <sub>K</sub> _CDR1_A3	cgagcaagtgaaaacattacagttatttagca
66	nt V <sub>K</sub> _CDR2_A3	aatacaaaaaccttaggagaa
67	nt V <sub>K</sub> _CDR3_A3	caacatcattatggtactccattcacg
68	IGHV1-69*01 (AC073939)	ggctacacctcaccagctactggatgcactgg
69	IGHV1-69*01 (AC073939)	ggagagattgatccttctgatagttataactaactacaatcaaaagttaag
70	IGKV12-44*01 (AJ235955)	cgagcaagtgagaatattacagttatttagca
71	IGKV12-44*01 (AJ235955)	aatgcaaaaaccttagcagaa

ES 2 640 960 T3

72 IGKV12-44\*01 caacatcattatggtactcctcc  
(AJ235955)

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo o porción del mismo de unión al antígeno que se une específicamente a BST-1 que comprende:
  - a) una región variable de cadena pesada que comprende:
    - i) una primera vhCDR que comprende la SEQ ID NO: 10;
    - 5 ii) una segunda vhCDR que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 51;
    - iii) una tercera vhCDR que comprende la SEQ ID NO: 14; y
  - b) una región variable de cadena ligera que comprende:
    - i) una primera vlCDR que comprende la SEQ ID NO: 16;
    - 10 ii) una segunda vlCDR que comprende la SEQ ID NO: 18; y
    - iii) una tercera vlCDR que comprende una SEQ ID NO: 20.
2. El anticuerpo o porción del mismo de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
  - a) una cadena pesada al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 2, y una cadena ligera al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 4; o
  - 15 b) una cadena pesada al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 46, y una cadena ligera al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 49.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa de un isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 20 4. El anticuerpo o una o porción del mismo de unión al antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además una fracción unida covalentemente, opcionalmente en donde dicha fracción es un fármaco.
5. El anticuerpo o una o porción del mismo de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho fármaco se selecciona del grupo que consiste en un maitansinoide, una dolastatina, una auristatina, un tricoteceno, una caliqueamicina, CC1065 y derivados de los mismos.
- 25 6. El anticuerpo o una o porción del mismo de unión al antígeno de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde dicho anticuerpo o porción del mismo de unión al antígeno induce citotoxicidad de células T y/o es un anticuerpo biespecífico.
7. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho anticuerpo induce citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), opcionalmente en donde el anticuerpo es un anticuerpo manipulado que tiene una mayor unión a receptores de Fc y/o mayor potencia para ADCC.
- 30 8. El anticuerpo o porción del mismo de unión al antígeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico o multiespecífico que se une específicamente a un primer antígeno que comprende BST1 y un segundo antígeno seleccionado del grupo que consiste en antígeno CD3 y antígeno CD5.
- 35 9. Un ácido nucleico que codifica:
  - a) una cadena pesada del anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno de cualquier reivindicación precedente; y
  - b) una cadena ligera del anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno de cualquier reivindicación precedente.
- 40 10. Una célula huésped que contiene el ácido nucleico de la reivindicación 9.
11. Un método para preparar un anticuerpo o porción del mismo de unión al antígeno que comprende el cultivo de una célula huésped de acuerdo con la reivindicación 10 en condiciones en las que se expresa el anticuerpo o una o porción del mismo de unión al antígeno y opcionalmente aislando el anticuerpo o una o porción del mismo de unión al antígeno.
- 45

12. El anticuerpo o una o porción del mismo de unión al antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para uso en terapia en la que:

a) el anticuerpo o porción del mismo de unión al antígeno se interioriza mediante una célula que expresa BST1, comprendiendo dicho anticuerpo un conjugado de fármaco unido covalentemente; o

5 b) el anticuerpo induce citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad de células T.

13. El anticuerpo o una o porción del mismo de unión al antígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el uso es el tratamiento de cáncer, incluyendo leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica de células B, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, 10 cáncer de ovario o cáncer pancreático.

14. Un anticuerpo o porción del mismo de unión al antígeno como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 para uso en terapia o para uso como un medicamento.

**Alineaciones de VH CDR1**

**A1**

SEQ ID No: 21      ggctacgcattcagtaactcctggataaactgg  
SEQ ID No: 33      ggctacgcattcagtagctactggatgaactgg  
\*\*\*\*\* \* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

**A2**

SEQ ID No: 22      ggttactcattcattgagtacaccataaactgg  
SEQ ID No: 35      ggttactcattcactgactacaacatgaactgg  
\*\*\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \*\*\*\*\*

**A3**

SEQ ID No: 62      ggctacacattctctgactactgggtactctgg  
SEQ ID No: 68      ggctacaccttcaccagctactggatgcactgg  
\*\*\*\*\* \* \* \* \* \* \* \* \*\*\*\*\*

**Figura 1a**

**Alineaciones de VH CDR2**

**A1**

SEQ ID No: 23      ggacagatttatcctgggagattatgataactaactacaatggaaaattcaag  
SEQ ID No: 34      ggacagatttatcctgggagatggtgataactaactacaacggaaagtccaag  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

**A2**

SEQ ID No: 24      ggaaatattgatccttattatggaaccacttattacaatcagatgttcacg  
SEQ ID No: 36      ggagtaattaatcctaactatgggtactactagctacaatcagaagtccaag  
\* \*

**A3**

SEQ ID No: 63      ggagcgattgatggttctgatacttttaatgactacagtcagaagtttaag  
SEQ ID No: 69      ggagagattgatccttctgatagttataactaactacaatcaaaagtccaag  
\* \*

**Figura 1b**

**Alineaciones de VK CDR1**

**A1**  
 SEQ ID No: 27      actgccagctcacgtgtaagttccagttacttgcac  
 SEQ ID No: 37      actgccagctcaagtgtaagttccagttacttgcac  
 \*\*\*\*\*

**A2**  
 SEQ ID No: 28      agtgccagctcaagtgtaacttacatgtac  
 SEQ ID No: 40      agtgccagctcaagtgtaagttacatgtac  
 \*\*\*\*\*

**A3**  
 SEQ ID No: 65      cgagcaagtgaaaacatttacagttatttagca  
 SEQ ID No: 70      cgagcaagtgagaatatttacagttatttagca  
 \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

**Figura 2a**

**Alineaciones de VK CDR2**

**A1**  
 SEQ ID No: 29      agtacatccaacctggcttct  
 SEQ ID No: 38      agcacatccaacctggcttct  
 \*\* \*\*\*\*\*

**A2**  
 SEQ ID No: 30      gacacatccaacctggcttct  
 SEQ ID No: 41      gacacatccaacctggcttct  
 \*\*\*\*\*

**A3**  
 SEQ ID No: 66      aatacaaaaaccttaggagaa  
 SEQ ID No: 71      aatgcaaaaaccttagcagaa  
 \*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*

**Figura 2b**

**Alineaciones de VK CDR3**

**A1**  
 SEQ ID No: 31      caccagtatcatcgttccccgtacacg  
 SEQ ID No: 39      caccagtatcatcgttccccaccca--  
 \*\*\*\*\* \*\*

**A2**  
 SEQ ID No: 32      cagcagtgaggagtaattaccactcagc  
 SEQ ID No: 42      cagcagtgaggagtagttaccaccca--  
 \*\*\*\*\* \*\*

**A3**  
 SEQ ID No: 67      caacatcattatggtactccattcagc  
 SEQ ID No: 72      caacatcattatggtactcctcc----  
 \*\*\*\*\*

**Figura 2c**

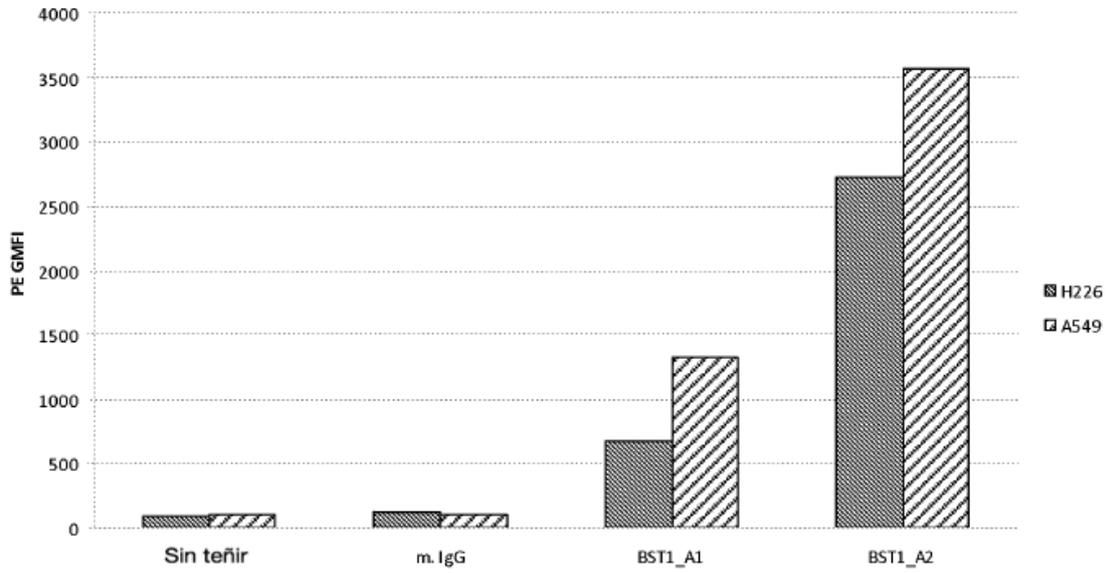


Figura 3a

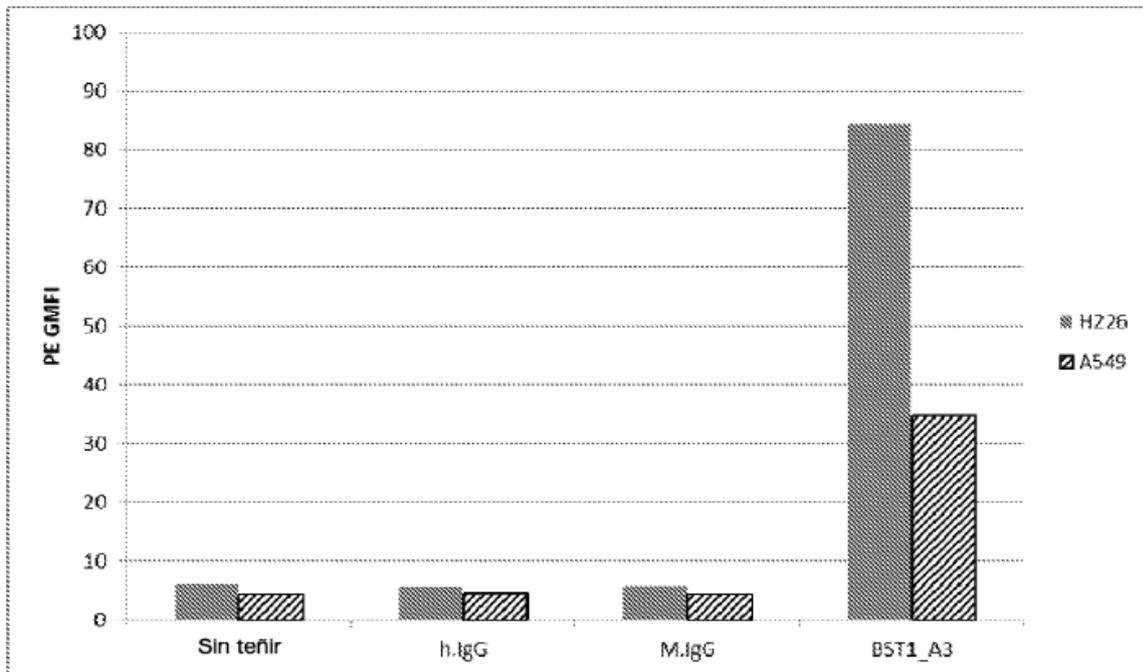


Figura 3b

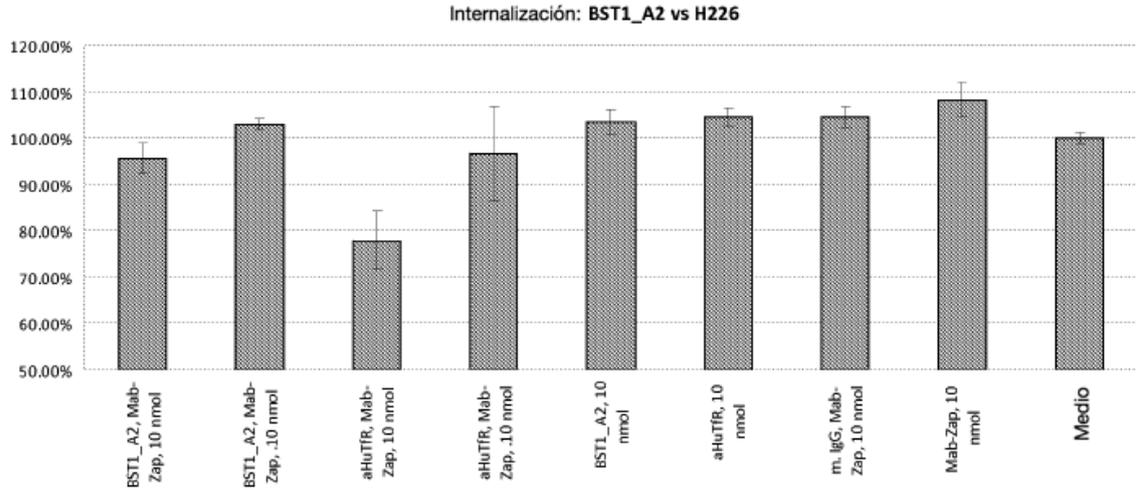


Figura 4a

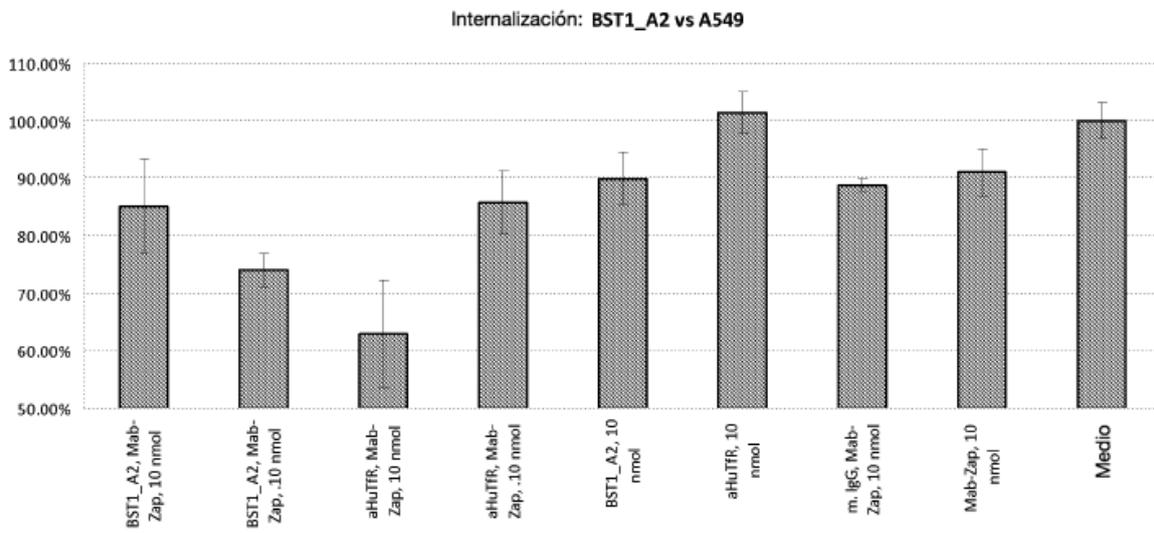


Figura 4b

# ES 2 640 960 T3

		1	2	3	4
	123456789	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
SEQ ID No: 45	QAYLQQSGP	ELVKAGASVK	MSCKASGYSF	<b>IEY</b> TINWVKQ	SHGKSLEWIG
SEQ ID No: 46	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYSF	<b>I</b> EY <u>TIN</u> WVRQ	APGQGLEWIG
SEQ ID No: 47	QVQLVQSGA	EVKKPGASVK	VSCKASGYSF	TXXXXXWVRQ	APGQGLEWIG
		5	6	7	8
	01223456789	0123456789	0123456789	0122223456789	
SEQ ID No: 45	<b>NIDPYYGTTY</b>	<b>NQMFTG</b> KATL	TVDQSSNTAY	MQLKSLTSEDSAV	
SEQ ID No: 46	<b>NIDPYYGTTY</b>	<b>NQMFTG</b> <u>R</u> ATL	TV <u>D</u> TSISTAY	MELSRLRSDDTAV	
SEQ ID No: 47	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXRVTL	TRDTSISTAY	MELSRLRSDDTAV	
		1	1		
	9	0	1		
	0123456789	0123456789	0123		
SEQ ID No: 45	YFCAR <b>GSAWF</b>	-PYWGQTLV	TVSA		
SEQ ID No: 46	YFCAR <b>GSAWF</b>	-PYWGQTLV	<u>T</u> VSS		
SEQ ID No: 47	YFCARXXXXX	XXXWGQTLV	PVSS		

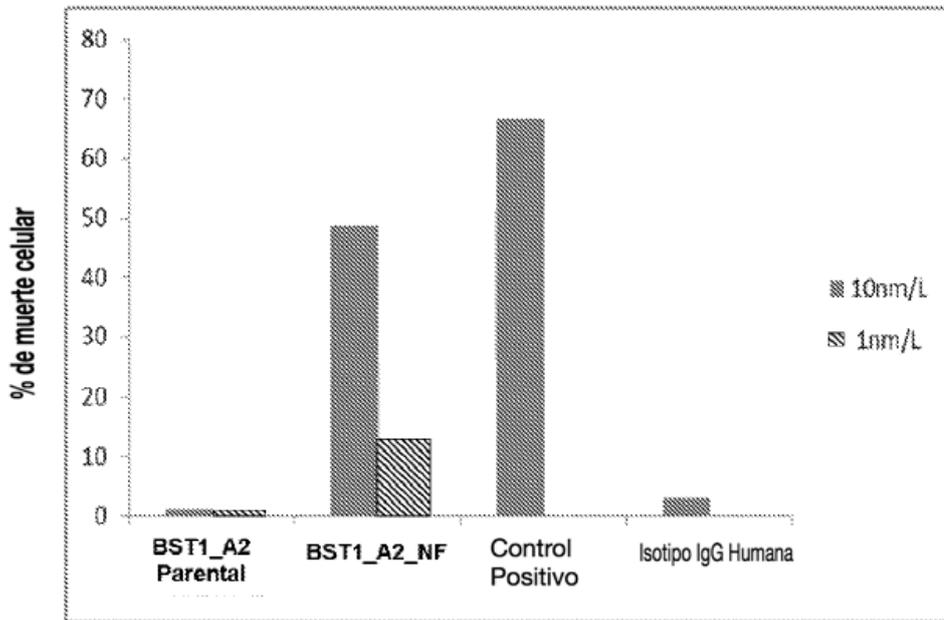
## Figura 5

		1	2	3	
	123456789	0123456789	0123456789	0123456789	
SEQ ID No: 48	DIVMSQSPA	IMSASPGEKV	TMTCSAS-SS	<b>VTYMYWYQ</b> QK	
SEQ ID No: 49	DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCSAS-SS	<b>VTYMYWYQ</b> QK	
SEQ ID No: 50	DIQMTQSPS	SLSASVGDRV	TITCXXXXXX	XXXXXWYQK	
		4	5	6	7
	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789	
SEQ ID No: 48	PGSSPRLLIY	<b>DTSN</b> LASGVP	VRFSGSGSGT	SYSLTISRME	
SEQ ID No: 49	PGKAPKLLIY	<b>DTSN</b> LASGVP	SRFSGSGSGT	<u>D</u> YTLTISLQ	
SEQ ID No: 50	PGKAPKLLIY	XXXXXXXXGVP	SRFSGSGSGT	DFTLTISLQ	
			1		
	8	9	0		
	0123456789	0123456789	01234567		
SEQ ID No: 48	AEDTATYYCQ	<b>QWSNYPL</b> TFG	AGTKLELK		
SEQ ID No: 49	PEDFATYYCQ	<b>QWSNYPL</b> TFG	QGTKVEIK		
SEQ ID No: 50	PEDFATYYCX	XXXXXXXXXFG	QGTKVEIK		

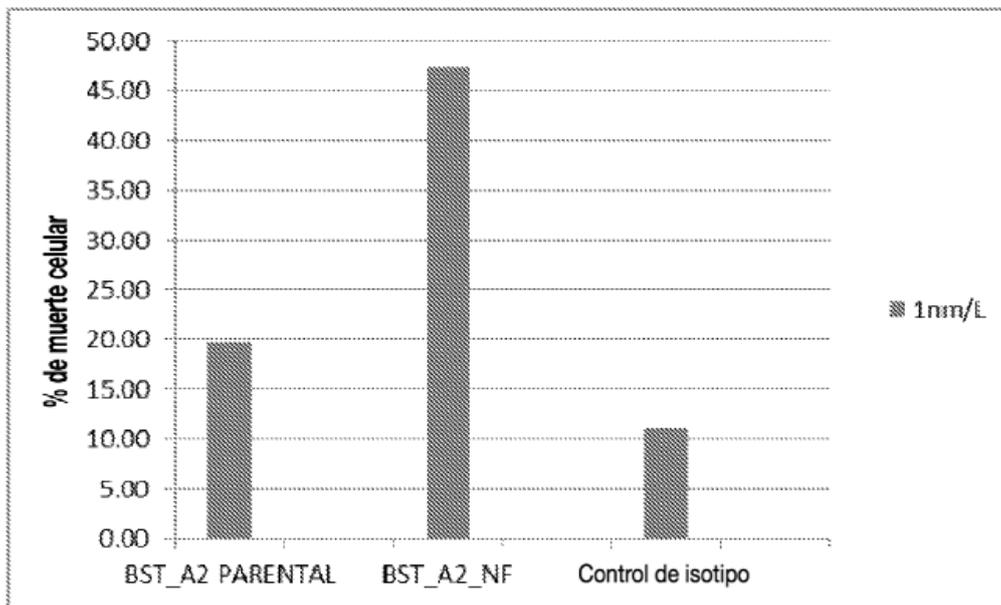
## Figura 6

SEQ ID No: 12	GNIDPYYGTTYYNQMFT
SEQ ID No: 51	GNIDPYYGTTYYNQM <u>F</u>

## Figura 7



**Figura 8a**



**Figura 8b**