

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 388**

51 Int. Cl.:

**A61K 47/64** (2007.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

**C07K 16/36** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2011 PCT/EP2011/059917**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11157741**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2011 E 11725095 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2582728**

54 Título: **Conjugados farmacológicos de anticuerpos humanos contra factor tisular**

30 Prioridad:

**20.01.2011 US 201161434776 P**

**20.01.2011 DK 201100039**

**15.06.2010 US 354970 P**

**15.06.2010 DK 201000529**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.12.2017**

73 Titular/es:

**GENMAB A/S (100.0%)**

**Kalvebod Brygge 43**

**1560 Copenhagen V, DK**

72 Inventor/es:

**SATIJN, DAVID;**

**VERPLOEGEN, SANDRA;**

**BLEEKER, WIM;**

**LISBY, STEEN;**

**WINKEL, JAN VAN DE;**

**BERKEL, PATRICK VAN y**

**PARREN, PAUL**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 647 388 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Conjugados farmacológicos de anticuerpos humanos contra factor tisular

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a conjugados farmacológicos de anticuerpos (ADC), donde los anticuerpos se unen con un epítipo en el factor tisular. Dichos ADC son útiles en particular en el tratamiento del cáncer, la inflamación y enfermedades vasculares.

10

**Antecedentes de la invención**

El factor tisular (FT), también denominado tromboplastina, factor III o CD142 es una proteína presente en el tejido subendotelial, plaquetas y leucocitos necesaria para el inicio de la formación de trombina a partir del zimógeno protrombina. La formación de trombina conduce en última instancia a la coagulación de la sangre. El factor tisular permite que las células inicien las cascadas de coagulación sanguínea, y actúa como el receptor de alta afinidad para el factor de coagulación VII (FVII), una serina proteasa. El complejo resultante proporciona un acontecimiento catalítico que es responsable del inicio de las cascadas de proteasa de coagulación por proteólisis limitada específica. A diferencia de los otros cofactores de estas cascadas de proteasa, que circulan como precursores no funcionales, este factor es un potente iniciador que es completamente funcional cuando se expresa en superficies celulares.

15

20

25

30

El factor tisular es el receptor de superficie celular para el factor de serina proteasa VIIa (FVIIa). La unión de FVIIa con factor tisular inicia procesos de señalización dentro de la célula, desempeñando dicha función de señalización un papel en la angiogénesis. Mientras que la angiogénesis es un proceso normal en el crecimiento y desarrollo, así como en la curación de heridas, también es una etapa fundamental en la transición de tumores de un estado durmiente a un estado maligno; cuando las células cancerosas obtienen la capacidad de producir proteínas que participan en la angiogénesis, los denominados factores de crecimiento angiogénicos, estas proteínas son liberadas por el tumor a tejidos cercanos, y estimulan el brote de nuevos vasos sanguíneos desde vasos sanguíneos sanos existentes hacia y en el tumor. Una vez que nuevos vasos sanguíneos entran en el tumor, este puede expandir rápidamente su tamaño e invadir tejido y órganos locales. A través de los nuevos vasos sanguíneos, las células cancerosas pueden escapar adicionalmente a la circulación y alojarse en otros órganos para formar nuevos tumores (metástasis).

35

Además, el FT desempeña un papel en la inflamación. Se supone que el papel de FT está mediado por la coagulación sanguínea (A. J. Chu: "Tissue factor mediates inflammation" en Archives of biochemistry and biophysics, 2005, vol. 440, n.º 2, pp. 123-132). En consecuencia, la inhibición de FT, por ejemplo por un anticuerpo monoclonal anti FT es importante en la interrupción del ciclo de coagulación-inflamación en la contribución no solamente a antiinflamación sino también a enfermedades vasculares.

40

Se observa expresión de FT en muchos tipos de cáncer y se asocia con una enfermedad más agresiva. Además, también existe FT humano en una forma de corte y empalme alternativo soluble, FTHca. Se ha descubierto recientemente que FTHca promueve el crecimiento tumoral (Hobbs *et al.*, 2007 Thrombosis Res. 120(2) S13-S21).

45

Baiyang Wang *et al.* (D4) desvela un anticuerpo murino internalizante de alta afinidad para factor tisular humano. El anticuerpo marcado con 90Y se describe como retardante del crecimiento de xenoinjertos tumorales en ratones inmunocomprometidos. También se sugiere conjugar ciertos profármacos con el anticuerpo, tales como derivados de maitansinoides.

50

Aunque se ha realizado mucho progreso, sigue existiendo la necesidad de métodos mejorados para tratar enfermedades graves, por ejemplo tratamiento mejorado del cáncer, inflamación y enfermedad vascular basados en anticuerpos terapéuticos.

55

Es en consecuencia un objeto de la presente invención proporcionar conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT alternante específicos y eficaces, en particular para el uso en el tratamiento de cáncer.

**Sumario de la invención**

60

La presente invención se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo que comprende un anticuerpo que se une con factor tisular, donde el anticuerpo se ha conjugado con una auristatina o un análogo de péptido funcional o derivado del mismo mediante un enlazador, y donde el anticuerpo del conjugado comprende una región VH que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y una región CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8, y una región VL que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 46, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 47 y una región CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 48. Dichos

65

nuevos conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT son útiles para el tratamiento de cáncer, inflamación y enfermedades vasculares. Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención son altamente eficaces en la destrucción de células que expresan factor tisular (FT). Además, los conjugados farmacológicos de anticuerpos anti FT son ventajosos por tener inhibición limitada o no tener inhibición de la coagulación.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Alineamiento de secuencias de los anticuerpos de la presente invención.

Las SEQ ID NO se enumeran entre paréntesis a la derecha de la secuencia.

CDR1, CDR2 y CDR3 de acuerdo con Kabat se indican de la siguiente manera: las secuencias en cursiva y negrita representan la región CDR1, las secuencias subrayadas representan la región CDR2, las secuencias en negrita representan la región CDR3.

Figura 2: Secuencias de IgG4 (SEQ ID NO: 81-82)

SEQ ID NO: 81: La secuencia de aminoácidos de la región CH de tipo silvestre de IgG4 humana. Las secuencias en cursiva representan la región CH1, las secuencias destacadas representan la región bisagra, las secuencias regulares representan la región CH2 y las secuencias subrayadas representan la región CH3.

SEQ ID NO: 82: La secuencia de aminoácidos de la región CH sin bisagra de un IgG4 humano

Figura 3: Unión de HuMab anti FT con el dominio extracelular de FT. La unión se determinó por ELISA. Los valores de  $CE_{50}$  son la media de 3 experimentos.

Figura 4: Unión de HuMab anti FT con FT unido a membrana en células MDA-MD-231. La unión se determinó por análisis de FACS y los anticuerpos se dividieron en tres grupos mostrados en a), b) y c), véase también documento WO 10/066803 donde los anticuerpos se dividieron en grupos de bloqueo cruzado.

Figura 5: Inhibición de la unión de FVIIa por HuMab anti FT, se midió por análisis de FACS. Los datos mostrados son las intensidades de fluorescencia medias (IFM) para unión a FVIIa en presencia de concentraciones crecientes de HuMab anti FT. La IFM para FVIIa 100 nM en ausencia de HuMab anti FT fue de 149.942. Se muestra un experimento representativo.

Figura 6: Inducción dependiente de dosis de destrucción de células por HuMab anti FT conjugados con anti kappa ETA.

Figura 7: Unión de HuMab anti FT y ADC con proteína recombinante del dominio extracelular de FT, determinado por ELISA. Se muestra un experimento representativo.

Figura 8: Inducción dependiente de dosis *in vitro* de destrucción celular por ADC anti FT. Se muestra un experimento representativo para cada línea celular: A431 (a), HPAF-II (b) y NCI-H441 (c). Los datos mostrados son porcentajes de supervivencia  $\pm$  E.T.M. de pocillos por duplicado de células tratadas con ADC anti FT.

Figura 9: Eficacia *in vivo* de ADC anti FT en tratamiento terapéutico de xenoinjertos de A431 y HPAF-II en ratones SCID. Se trataron ratones con tumores A431 (A) o HPAF-II (B) establecidos con ADC anti FT. Los datos mostrados son los volúmenes tumorales medios  $\pm$  E.T.M. por grupo (n = 7 ratones por grupo).

Figura 10: Análisis por SDS-PAGE de ADC e IgG1 no conjugado para ensayar la estabilidad. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE al comienzo del estudio (t = 0) (a-d) o después de almacenamiento a 5 °C y < -65 °C durante tres meses (e-h). (a, c) carril 1, 9: marcador de peso molecular (PM), carril 2: control interno de IgG1, carril 3: HuMab-TF-098, carril 4: HuMab-TF-098-vcMMAE, carril 5: HuMab-TF-098-mcMMAF, carril 6: HuMab-TF-011, carril 7: HuMab-TF-011-vcMMAE, carril 8: HuMab-TF-mcMMAF. (b, d) carril 1, 9, 10: marcador de PM, carril 2: control interno de IgG1, carril 3: HuMab-TF-111, carril 4: HuMab-TF-111-vcMMAE, carril 5: HuMab-TF-111-mcMMAF, carril 6: IgG1-b12, carril 7: IgG1-b12-vcMMAE, carril 8: IgG1-b12-mcMMAF.

(e, g) carril 1,11: marcador de PM, carril 2: control interno de IgG1, carril 3: HuMab-TF-098-vcMMAE después de 3 meses a < -65 °C, carril 4: HuMab-TF-098-vcMMAE después de 3 meses a 5 °C, carril 5: HuMab-TF-098-mcMMAF después de 3 meses a < -65 °C, carril 6: HuMab-TF-098-mcMMAF después de 3 meses a 5 °C, carril 7: HuMab-TF-011-vcMMAE después de 3 meses a < -65 °C, carril 8: HuMab-TF-011-vcMMAE después de 3 meses a 5 °C, carril 9: HuMab-TF-011-mcMMAF después de 3 meses a < -65 °C, carril 10: HuMab-TF-011-mcMMAF después de 3 meses a 5 °C. (f, h) carril 1, 11, 12: marcador de PM, carril 2: control interno IgG1, carril 3: HuMab-TF-111-vcMMAE después de 3 meses a < -65 °C, carril 4: HuMab-TF-111-vcMMAE después de 3 meses a 5 °C, carril 5: HuMab-TF-111-mcMMAF después de 3 meses a < -65 °C, carril 6: HuMab-TF-111-mcMMAF después de 3 meses a 5 °C, carril 7: IgG1-b12-vcMMAE después de 3 meses a < -65 °C, carril 8: IgG1-b12-vcMMAE después de tres meses a 5 °C, carril 9: IgG1-b12-mcMMAF después de 3 meses a < -65 °C, carril 10: IgG1-b12-mcMMAF después de 3 meses a 5 °C.

Para condiciones no reductoras, se indican tamaños de diferentes combinaciones de cadena pesada (H) - cadena ligera (L): 148 kDa (HLL), 125 kDa (HHL), 99 kDa (HH), 67 kDa (HL), 51 kDa (H) y 25 kDa (L).

Figura 11: Perfiles de cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HP-SEC) de HuMab-TF-098-vcMMAE (a), HuMab-TF-098-mcMMAF (b), HuMab-TF-011-vcMMAE (c), HuMab-TF-011-mcMMAF (d), HuMab-TF-111-vcMMAE (e), HuMab-TF-111-mcMMAF (f), IgG1-b12-vcMMAE (g) y IgG1-b12-mcMMAF (h) al comienzo del estudio y después de almacenamiento a < -65 °C o 5 °C durante tres meses.

Figura 12: Ensayo de unión de ADC e IgG1 no conjugado con FT-ECDHis para ensayar la estabilidad. Las muestras se analizaron con respecto a unión al comienzo del estudio (t = 0) o después de almacenamiento a 5 °C y < -65 °C durante tres meses.

Figura 13: Respuesta a dosis *in vivo* de ADC anti FT en tratamiento terapéutico de xenoinjertos HPAF-II en ratones SCID. Se trataron ratones con tumores HPAF-II establecidos con ADC anti FT vcMMAE. Los datos

mostrados son volúmenes tumorales medios  $\pm$  E.T.M. por grupo (n = 8 ratones por grupo).

## Descripción detallada de la invención

### 5 Definiciones

Las expresiones "factor tisular", "FT", "CD142", "antígeno de factor tisular", "antígeno FT" y "antígeno CD142" se usan indistintamente en el presente documento y, a no ser que se especifique de otro modo, incluyen cualquier variante, isoforma y homólogo de especie del factor tisular humano que se expresan de forma natural por células o se expresan en células transfectadas con el gen de factor tisular. El factor tisular puede ser la secuencia de referencia de Genbank NP\_001984 usada en el ejemplo 1.

El término "inmunoglobulina" se refiere a una clase de glucoproteínas estructuralmente relacionadas que consisten en dos pares de cadenas polipeptídicas, un par de cadenas ligeras (L) de bajo peso molecular y un par de cadenas pesadas (H), las cuatro interconectadas por enlaces disulfuro. La estructura de inmunoglobulinas se ha caracterizado bien. Véase por ejemplo *Fundamental Immunology* C. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N. Y. (1989)). Brevemente, cada cadena pesada típicamente está comprendida por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como  $V_H$  o  $VH$ ) y una región constante de cadena pesada ( $C_H$  o  $CH$ ). La región constante de cadena pesada está comprendida típicamente por tres dominios,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . Cada cadena ligera está comprendida típicamente por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como  $V_L$  o  $VL$ ) y una región constante de cadena ligera ( $C_L$  o  $CL$ ). La región constante de cadena ligera está comprendida típicamente por un dominio,  $C_L$ . Las regiones  $V_H$  y  $V_L$  pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables, que pueden ser hipervariables en su secuencia y/o forma de bucles definidos estructuralmente), también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR). Cada  $V_H$  y  $V_L$  está compuesto típicamente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas del extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987)). Típicamente, la numeración de restos de aminoácidos en esta región se realiza por el método descrito en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (expresiones tales como numeración de resto de dominio variable como en Kabat o de acuerdo con Kabat en el presente documento se refieren a este sistema de numeración para dominios variables de cadena pesada o dominios variables de cadena ligera). Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real de un péptido puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR de dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir un inserto de un único aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de CDR2 de  $V_H$  y restos insertados (por ejemplo restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de FR de cadena pesada. La numeración de Kabat de los restos puede determinarse por un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada por Kabat "convencional".

El término "anticuerpo" (Ab) en el contexto de la presente invención se refiere a una molécula de inmunoglobulina, un fragmento de una molécula de inmunoglobulina, o un derivado de una de las mismas, que tiene la capacidad para unirse específicamente con un antígeno en condiciones fisiológicas típicas con una semivida de periodos de tiempo significativos, tales como al menos aproximadamente 30 minutos, al menos aproximadamente 45 minutos, al menos aproximadamente una hora, al menos aproximadamente dos horas, al menos aproximadamente cuatro horas, al menos aproximadamente 8 horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 o más días, etc., o cualquier otro periodo definido funcionalmente relevante (tal como un tiempo suficiente para inducir, promover, potenciar y/o modular una respuesta fisiológica asociada con unión de anticuerpo con el antígeno y/o tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora). Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ab) pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina con tejidos hospedadores o factores, incluyendo diversas células del sistema inmunitario (tales como células efectoras) y componentes del sistema del complemento tales como C1q, el primer componente en la ruta clásica de la activación del complemento. Como se ha indicado anteriormente, el término anticuerpo en el presente documento, a no ser que se indique de otro modo o esté claramente contradicho por el contexto, incluye fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente con el antígeno. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "anticuerpo" incluyen (i) un fragmento Fab' o Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  y  $C_{H1}$ , o un anticuerpo monovalente como se describe en el documento WO2007059782 (Genmab A/S); (ii) fragmentos  $F(ab')_2$ , fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste esencialmente en los dominios  $V_H$  y  $C_{H1}$ ; (iv) un fragmento Fv que consiste esencialmente en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de una única rama de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341, 544-546 (1989)), que consiste esencialmente en un dominio  $V_H$  y también denominado anticuerpos de dominio (Holt *et al.*; *Trends Biotechnol.* Nov 2003; 21(11): 484-90); (vi) de camélidos o nanocuerpos (Revets *et al.*; *Expert Opin Biol Ther.* Ene 2005; 5(1): 111-24) y (vii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada.

Además, aunque los dos dominios del fragmento  $V_L$  y  $V_H$ , están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que les permite prepararse como una única cadena proteica en la que las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como anticuerpos monocatenarios o  $F_v$  monocatenario (scFv), véase por ejemplo Bird *et al.*, Science 242, 423-426 (1988) y Huston *et al.*, PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Dichos anticuerpos monocatenarios están abarcados dentro del término anticuerpo a no ser que se indique de otro modo o esté indicado claramente por el contexto. Aunque dichos fragmentos se incluyen en general dentro del significado de anticuerpo, colectivamente y cada uno independientemente son elementos únicos de la presente invención, que muestran diferentes propiedades y utilidad biológicas. Estos y otros fragmentos de anticuerpo útiles en el contexto de la presente invención se analizan adicionalmente en el presente documento. También debería entenderse que el término anticuerpo, a no ser que se especifique de otro modo, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), polipéptidos de tipo anticuerpo, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados y fragmentos de anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente con el antígeno (fragmentos de unión a antígeno) proporcionada por cualquier técnica conocida, tal como escisión enzimática, síntesis de péptidos y técnicas recombinantes. Un anticuerpo como se genera puede poseer cualquier isotipo.

En el contexto de la presente invención el término "ADC" se refiere a un conjugado farmacológico de anticuerpo, que en el contexto de la presente invención se refiere a un anticuerpo anti FT, que está acoplado a otro resto como se describe en la presente solicitud.

Un "anticuerpo anti FT" es un anticuerpo como se ha descrito anteriormente, que se une específicamente con factor tisular antigénico o antígeno de factor tisular.

Se pretende que la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluya anticuerpos que tengan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, no se pretende que la expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluya 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 de marco conservado humanas.

En una realización preferida, se aísla el anticuerpo del conjugado farmacológico de anticuerpo o el conjugado farmacológico de anticuerpo de la invención. Se pretende que un "anticuerpo aislado" o "conjugado farmacológico de anticuerpo aislado" como se usa en el presente documento, se refiera a un anticuerpo o conjugado farmacológico de anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo un anticuerpo aislado que se une específicamente con un factor tisular está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente con antígenos distintos del factor tisular). Se pretende que un conjugado farmacológico de anticuerpo aislado, como se usa en el presente documento, se refiera a un conjugado farmacológico de anticuerpo que también está sustancialmente libre de "toxina libre", donde se pretende que "toxina libre" signifique toxina que no está conjugada con el anticuerpo. La expresión "sustancialmente libre de" como se usa en relación con la toxina puede significar en particular que menos del 5 %, tal como menos del 4 %, o menos del 3 %, o menos del 2 %, o menos del 1,5 %, o menos del 1 %, o menos del 0,5 % de fármaco no conjugado está presente cuando se determina como se describe en el Ejemplo 16. Un anticuerpo aislado o conjugado farmacológico de anticuerpo aislado que se une específicamente con un epítipo, una isoforma o una variante de factor tisular humano pueden tener, sin embargo, reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo de otra especie (tal como homólogos de especie de factor tisular). Además, un anticuerpo aislado o conjugado farmacológico de anticuerpo puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. En una realización de la presente invención, dos o más anticuerpos monoclonales "aislados" o conjugados farmacológicos de anticuerpos que tienen diferentes especificidades de unión a antígeno se combinan en una composición bien definida.

Como se usa en el presente documento en el contexto de dos o más anticuerpos, la expresión "compite con" o "compite de forma cruzada con" indica que los dos o más anticuerpos compiten por la unión con FT, por ejemplo, compiten por la unión con FT en el ensayo como se describe en el Ejemplo 12 del documento WO 10/066803. Para algunos pares de anticuerpos, solamente se observa competición como en el ensayo del Ejemplo 12 del documento WO 10/066803 cuando un anticuerpo recubre la placa y el otro se usa para competir, y no viceversa. También se pretende que la expresión "compite con" cuando se usa en el presente documento abarque dichas combinaciones de anticuerpos.

Las expresiones "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular individual. El anticuerpo monoclonal o la composición del mismo pueden ser anticuerpos conjugados en fármacos de acuerdo con la presente invención. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. En consecuencia, la expresión "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de

secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden generarse por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal transgénico o transcromosómico no humano, tal como un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera, fusionado con una célula inmortalizada.

5 Como se usa en el presente documento, las expresiones “unión” o “se une específicamente” en el contexto de la unión de un anticuerpo con un antígeno predeterminado típicamente son una unión con una afinidad que corresponde a una  $K_D$  de aproximadamente  $10^{-7}$  M o menos, tal como aproximadamente  $10^{-8}$  M o menos, tal como aproximadamente  $10^{-9}$  M o menos, aproximadamente  $10^{-10}$  M o menos, o aproximadamente  $10^{-11}$  M o incluso menos  
10 cuando se determina por ejemplo mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 usando el antígeno como el ligando y el anticuerpo como el analito, y se une con el antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una  $K_D$  que es al menos diez veces menor, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo al menos 1.000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo al menos 100.000 veces menor que su afinidad por la unión con un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. La cantidad con la que la afinidad es menor depende de la  $K_D$  del anticuerpo, de modo que cuando la  $K_D$  del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), entonces la cantidad con la que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser al menos 10.000 veces.

20 El término " $k_d$ " ( $s^{-1}$ ), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular. Dicho valor también se denomina valor  $k_{off}$ .

El término " $k_a$ " ( $M^{-1} \times s^{-1}$ ), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de velocidad de asociación de una interacción de anticuerpo-antígeno particular.

25 El término " $K_D$ " (M), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación en equilibrio de una interacción de anticuerpo-antígeno particular.

30 El término " $K_A$ " ( $M^{-1}$ ), como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de asociación en equilibrio de una interacción de anticuerpo-antígeno particular y se obtiene dividiendo la  $k_a$  por la  $k_d$ .

Como se usa en el presente documento, el término “internalización”, cuando se usa en el contexto de un anticuerpo de FT incluye cualquier mecanismo por el que el anticuerpo se internaliza en una célula que expresa FT de la superficie celular. La internalización de un anticuerpo puede evaluarse en un ensayo indirecto o directo donde se mide el efecto de un conjugado de anticuerpo-toxina internalizado o complejo (tal como, por ejemplo, el ensayo anti kappa-ETA' del Ejemplo 15 o la internalización y el ensayo de destrucción celular del Ejemplo 18). En general, un ensayo directo se usa para medir la internalización de conjugados farmacológicos de anticuerpo, tal como el ensayo descrito en el Ejemplo 18 del presente documento, mientras que pueden usarse ensayos indirectos para medir la internalización de anticuerpos que después se preincuban con un anticuerpo conjugado secundario, tal como el ensayo descrito en el Ejemplo 15 en el presente documento.

También se desvelan en el presente documento anticuerpos que comprenden variantes funcionales de la región  $V_L$ , región  $V_H$  o una o más CDR de los anticuerpos de los ejemplos. Una variante funcional de un  $V_L$ ,  $V_H$  o CDR usado en el contexto de un anticuerpo anti FT aún permite que el anticuerpo conserve al menos una proporción sustancial (al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o más) de la afinidad/avidez y/o la especificidad/selectividad del anticuerpo parental y en algunos casos dicho anticuerpo anti FT puede asociarse con mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el anticuerpo parental.

50 Dichas variantes funcionales típicamente conservan identidad de secuencia significativa con el anticuerpo parental. El porcentaje de identidad entre dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = número de posiciones idénticas/número total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación de porcentaje de identidad entre dos secuencias puede conseguirse usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes  
55 posteriores.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller., Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988)) que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de restos 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 puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

La secuencia de variantes de CDR puede diferir de la secuencia de la CDR de las secuencias del anticuerpo parental a través de sustituciones en su mayoría conservativas; por ejemplo al menos aproximadamente 35 %, aproximadamente 50 % o más, aproximadamente 60 % o más, aproximadamente 70 % o más, aproximadamente 75 % o más, aproximadamente 80 % o más, aproximadamente 85 % o más, aproximadamente 90 % o más, aproximadamente 95 % o más (por ejemplo, aproximadamente 65-99 %, tal como aproximadamente 96 %, 97 % o 98 %) de las sustituciones en la variante son reemplazos de restos de aminoácidos conservativos.

La secuencia de variantes de CDR puede diferir de la secuencia de la CDR de las secuencias de anticuerpo parental mediante sustituciones en su mayoría conservativas; por ejemplo al menos 10, tal como al menos 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 de las sustituciones en la variante son reemplazos de restos de aminoácidos conservativos.

En el contexto de la presente invención, pueden definirse sustituciones conservativas por sustituciones dentro de las clases de aminoácidos reflejadas en una o más de las siguientes tres tablas:

**Clases de restos de aminoácidos para sustituciones conservativas**

Restos Ácidos	Asp (D) y Glu (E)
Restos Básicos	Lys (K), Arg (R) e His (H)
Restos sin Carga Hidrófilos	Ser (S), Thr (T), Asn (N) y Gln (Q)
Restos sin Carga Alifáticos	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I)
Restos sin Carga No Polares	Cys (C), Met (M) y Pro (P)
Restos Aromáticos	Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W)

**Clases de sustitución de restos de aminoácidos conservativa alternativa**

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

**Clasificaciones físicas y funcionales alternativas de restos de aminoácidos**

Restos que contienen grupos alcohólicos	S y T
Restos alifáticos	I, L, V y M
Restos asociados con cicloalqueno	F, H, W e Y
Restos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y
Restos con carga negativa	D y E
Restos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Restos con carga positiva	H, K y R
Restos pequeños	A, C, D, G, N, P, S, T y V
Restos muy pequeños	A, G y S
Restos implicados en la formación de vueltas	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T
Restos flexibles	Q, T, K, S, G, P, D, E y R

Más agrupamientos de sustituciones conservativas incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

También pueden formularse grupos adicionales de aminoácidos usando los principios descritos, por ejemplo, en Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2ª Ed. 1993), W. H. Freeman and Company.

En una realización de la presente invención, la conservación con respecto a propiedades hidropáticas/hidrófilas y peso/tamaño de restos también se conserva sustancialmente en una CDR variante en comparación con una CDR de un anticuerpo de los ejemplos (por ejemplo, la clase de peso, la puntuación hidropática o ambas de las secuencias están al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al

menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, o más (por ejemplo, aproximadamente 65-99 %) conservadas). Por ejemplo, las sustituciones de restos conservativos pueden también como alternativa basarse en el reemplazo de grupos de conservación basados en peso fuerte o débil, que se conocen en la técnica.

5 La conservación de restos similares puede también o como alternativa medirse por una puntuación de similitud, como se determina mediante el uso de un programa BLAST (por ejemplo, BLAST 2.2.8 disponible a través del NCBI usando ajustes convencionales BLOSUM62, Hueco Abierto = 11 y Hueco Extendido = 1). Las variantes adecuadas típicamente muestran al menos aproximadamente 45 %, tal como al menos aproximadamente 55 %, al menos  
10 aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o más (por ejemplo, aproximadamente 70-99 %) de similitud con el péptido parental.

15 Como se usa en este documento, "isotipo" se refiere a la clase de inmunoglobulina (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) que está codificada por genes de la región constante de cadena pesada.

20 El término "epítipo" significa un determinante proteico capaz de unirse específicamente con un anticuerpo. Los epítipos consisten habitualmente en agrupamientos de superficie de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen por que la unión de los primeros pero no de los últimos se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. El epítipo puede comprender restos de aminoácidos implicados directamente en la unión (también denominado componente inmunodominante del epítipo) y otros restos de aminoácidos, que no están implicados directamente en la unión, tales como restos de aminoácidos que se bloquean eficazmente por la el péptido de unión a antígenos  
25 específicamente (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella del péptido de unión a antígeno específicamente).

30 Como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano "deriva de" una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema que usa secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo inmunizando un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana o explorando una biblioteca de genes de inmunoglobulina humana, y donde el anticuerpo humano seleccionado es al menos 90 %, tal como al menos 95 %, por ejemplo al menos 96 %, tal como al menos 97 %, por ejemplo al menos 98 % o tal como al menos 99 % idéntico en su secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, fuera de la CDR3 de cadena pesada, un anticuerpo humano  
35 derivado de una secuencia de línea germinal humana particular no presentará más de 20 diferencias de aminoácidos, por ejemplo no más de 10 diferencias de aminoácidos, tal como no más de 9, 8, 7, 6 o 5, por ejemplo no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

40 Como se usa en el presente documento, se pretende que la expresión "inhibe el crecimiento" (por ejemplo en referencia a células, tales como células tumorales) incluya cualquier reducción medible en el crecimiento celular cuando se pone en contacto con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT en comparación con el crecimiento de las mismas células que no están en contacto con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT, por ejemplo, la inhibición del crecimiento de un cultivo celular en al menos aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %,  
45 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % o 100 %. Dicha reducción en el crecimiento celular puede producirse por una diversidad de mecanismos ejercidos por el anticuerpo anti FT y fármaco, bien individualmente o bien en combinación, por ejemplo, fagocitosis mediada por células dependientes de anticuerpo (ADCP), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad mediada por complemento (CDC) y/o apoptosis, o detención del ciclo celular en G2/M y apoptosis tal como puede inducirse por una interacción de la auristatina con tubulina.

50 La expresión "anticuerpo IgG4 estabilizado" se refiere a un anticuerpo IgG4 que se ha modificado para reducir el intercambio de media molécula (véase documentos WO 2008/145142 (Genmab A/S) o van der Neut Kofschoten M *et al.*, (2007) Science 14; 317 (5844) y referencias en los mismos).

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, a diferencia de las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias ejemplares incluyen una célula de un origen mieloide o linfoide, por ejemplo linfocitos (tales como linfocitos B y linfocitos T incluyendo linfocitos T citolíticos (CTL)), linfocitos citolíticos, linfocitos citolíticos naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, células polimorfonucleares, tales como neutrófilos, granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores de Fc específicos (FcR) y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. En algunas realizaciones, una célula efectora es capaz de inducir ADCC, tal como un linfocito citolítico natural, capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, que expresan FcR, están implicados en la destrucción específica de células diana y presentación de antígenos a otros  
60 componentes del sistema inmunitario, o unión con células que presentan antígenos. En algunas realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o una célula diana. La expresión de un FcR particular en una  
65

célula efectora puede regularse por factores humorales tales como citocinas. Por ejemplo, se ha descubierto que la expresión de FcγRI está regulada positivamente por interferón γ (IFN-γ) y/o factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF). Esta expresión potenciada aumenta la actividad citotóxica de células portadoras de FcγRI contra células diana. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno diana o una célula diana.

5 Se pretende que el término “vector”, como se usa en el presente documento, haga referencia a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico con el que está unida. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, donde segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma vírico. Ciertos  
10 vectores tienen capacidad de replicación autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (tales como vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora, y de ese modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes con los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinante” (o simplemente, “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión útiles en técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector”  
15 pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más habitualmente usada del vector. Sin embargo, se pretende que la presente invención incluya otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (tales como retrovirus defectuoso en replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que cumplen funciones equivalentes.

Se pretende que la expresión “célula hospedadora recombinante” (o simplemente “célula hospedadora”), como se usa en el presente documento, haga referencia a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión.  
25 Debería entenderse que se pretende que dichos términos se refieran no solamente a la célula objeto particular, sino también a la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden realizarse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o influencias ambientales, dicha descendencia puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aún estar incluida dentro del alcance de la expresión “célula hospedadora” como se usa en el presente documento. Las células hospedadoras recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como  
30 células CHO, células HEK293, células NS/0 y células linfocíticas.

El término “transfectoma”, como se usa en el presente documento, incluye células hospedadoras eucarióticas recombinantes que expresan el anticuerpo, tales como células CHO, células NS/0, células HEK293, células vegetales u hongos, incluyendo células de levadura.

35 La expresión “animal no humano transgénico” se refiere a un animal no humano que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes o transcromosomas de cadena pesada y/o ligera humanos (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar anticuerpos completamente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y un transgén de  
40 cadena pesada humana o transcromosoma de cadena pesada humana, de modo que el ratón produce anticuerpos anti FT humanos cuando se inmuniza con antígeno FT y/o células que expresan FT. El transgén de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como sucede para ratones transgénicos, por ejemplo ratones HuMAb, tales como ratones HCo7, HCo17, HCo20 o HCo12, o el transgén de cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como sucede para ratones KM transcromosómicos como se describe  
45 en el documento WO02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos (denominados colectivamente en el presente documento “ratones transgénicos”) son capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para un antígeno dado (tal como IgG, IgA, IgM, IgD y/o IgE) experimentando recombinación V-D-J y cambio de isotipo. También puede usarse un animal no humano, transgénico, para la producción de anticuerpos contra un antígeno específico introduciendo genes que codifican dicho anticuerpo específico, por  
50 ejemplo uniendo operativamente los genes con un gen que se expresa en la leche del animal.

“Tratamiento” se refiere a la administración de una cantidad eficaz de un compuesto terapéuticamente activo de la presente invención con el fin de facilitar, aliviar, detener o erradicar (curar) síntomas o patologías.

55 Una “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado farmacológico del anticuerpo anti FT puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz  
60 también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o parte de anticuerpo se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

Un anticuerpo “antiidiotípico” (Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo.

65

Aspectos y realizaciones adicionales de la invención

La invención proporciona un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT.

5 En un aspecto la invención proporciona un conjugado farmacológico de anticuerpo que comprende un anticuerpo que se une con factor tisular, donde el anticuerpo se ha conjugado con una auristatina o un análogo peptídico funcional o derivado del mismo mediante un enlazador, y donde el anticuerpo del conjugado comprende una región VH que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y una región CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8, y una región VL que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 46, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 47 y una región CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 48.

15 También se desvelan en el presente documento conjugados farmacológicos de anticuerpo que comprenden un anticuerpo que se une con factor tisular y que comprende:

(i) una región VH que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 34, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 35, y una región CDR3 que tiene una región que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 36, y una región VL que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 74, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 75, y una región CDR3 que tiene la región que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 76, o

(ii) una región VH que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 38, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 39 y una región CDR3 que tiene la región que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 40, y una región VL que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 78, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 79 y una región CDR3 que tiene la región que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 80, o

(iii) una región VH que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3 y una región CDR3 que tiene la región que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4, y una región VL que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 42, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 43 y una región CDR3 que tiene la región que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 44, o

(iv) una variante de cualquiera de dichos anticuerpos, donde dicha variante preferentemente tiene como máximo 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias,

donde el anticuerpo se ha conjugado con una auristatina o un análogo peptídico funcional o derivado del mismo mediante un enlazador.

45 En una realización, el anticuerpo comprende una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.

También se desvelan en el presente documento anticuerpos que comprenden:

50 (i) una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73, o

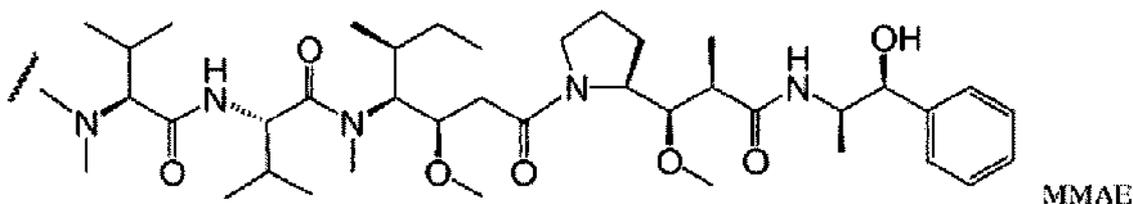
(ii) una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 37 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77, o

55 (iii) una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41

En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

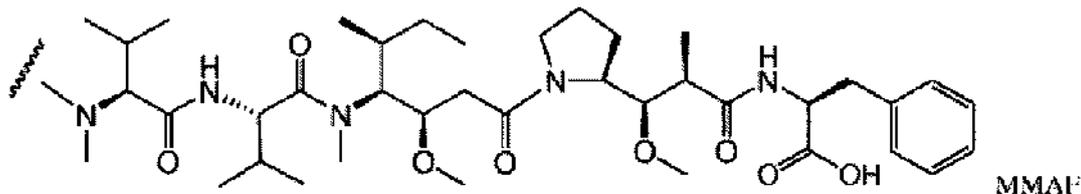
60 En una realización el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal completamente humano, tal como un IgG1,  $\kappa$ . En otra realización el anticuerpo es un anticuerpo IgG4 estabilizado monoclonal completamente humano.

En una realización, la auristatina es monometil auristatina E (MMAE):



donde la línea ondulada indica el sitio de unión para el enlazador.

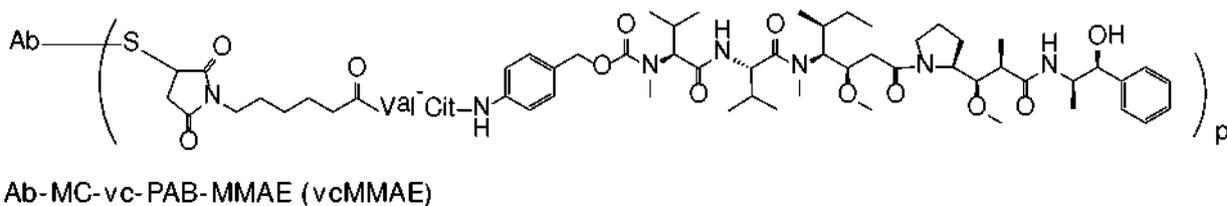
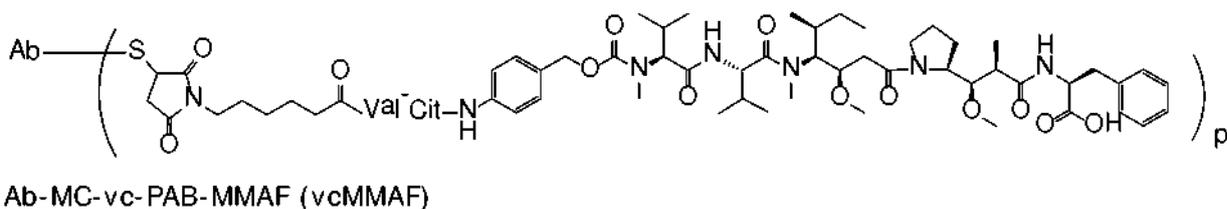
- 5 En una realización la auristatina es monometil auristatina F (MMAF):



donde la línea ondulada indica el sitio de unión para el enlazador.

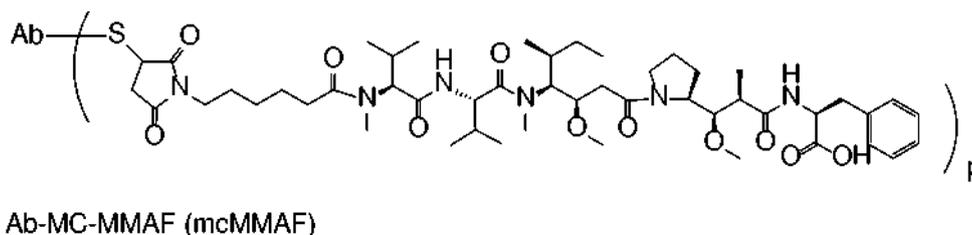
- 10 En una realización el enlazador está unido a restos de sulfhidrilo del anticuerpo anti FT obtenido por reducción (parcial) del anticuerpo anti FT.

- 15 En una realización, el enlazador-auristatina es MC-vc-PAB-MMAF (también designado vcMMAF) o MC-vc-PAB-MMAE (también designado vcMMAE):



- 20 donde p indica un número de 1 a 8, por ejemplo p puede ser de 3-5, S representa un resto de sulfhidrilo del anticuerpo anti FT, y Ab designa el anticuerpo anti FT. En una realización el enlazador-auristatina es vcMMAE.

En una realización, el enlazador-conjugado es mcMMAF (donde mc/MC es una abreviatura de maleimido-caproilo):



- 25 donde p indica un número de 1 a 8, por ejemplo p puede ser de 3-5, S representa un resto de sulfhidrilo del anticuerpo anti FT y Ab designa el anticuerpo anti FT.

- 30 En una realización, el anticuerpo bloquea la unión de FVIIa con factor tisular determinada, por ejemplo como se describe en el Ejemplo 14.

En una realización el anticuerpo inhibe la unión de FVIIa con el factor tisular, preferentemente con un valor máximo de  $CI_{50}$  de inhibición de entre 0,01-3,0  $\mu\text{g/ml}$ , o tal como 0,1-2,0  $\mu\text{g/ml}$ , o tal como 0,2-1,2  $\mu\text{g/ml}$  cuando se determina como se describe en el Ejemplo 14.

- 5 También se desvelan en el presente documento anticuerpos que compiten por la unión con el factor tisular con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, o  
 con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 41, o  
 10 con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 45, o  
 con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49, o  
 15 con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 53, o  
 con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 57, o  
 con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 61, o  
 20 con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 65, o  
 con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 69, o  
 25 con un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 37 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 77.

También se desvelan en el presente documento anticuerpos que comprenden:

- 30 a) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 34, 35 y 36 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 74, 75 y 76, o  
 b) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 2, 3 y 4 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 42, 43 y 44, o  
 c) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 6, 7 y 8 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 46, 47 y 48, o  
 35 d) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 10, 11 y 12 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 50, 51 y 52, o  
 e) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 14, 15 y 16 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 54, 55 y 56, o  
 f) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 18, 19 y 20 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 58, 59 y 60, o  
 40 g) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 22, 23 y 24 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 62, 63 y 64, o  
 h) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 26, 27 y 28 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 66, 67 y 68, o  
 45 i) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 30, 31 y 32 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 70, 71 y 72, o  
 j) una región VH que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 38, 39 y 40 y una región VL que comprende las secuencias de CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 78, 79 y 80, o  
 50 k) una variante de cualquiera de dichos anticuerpos, donde dicha variante preferentemente tiene como máximo 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en dichas secuencias.

También se desvelan en el presente documento anticuerpos que comprenden un VH que tiene

- 55 a) al menos 80 % de identidad, tal como al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % o 100 % de identidad con una secuencia de región VH seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 33, 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 37 y 29, o  
 b) como máximo 20, tal como 15, o 10, o 5, 4, 3, 2 o 1 modificaciones de aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con una  
 60 secuencia de región VH seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 33, 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 37 y 29.

También se desvelan en el presente documento anticuerpos que comprenden un VL que tiene

- 65 a) al menos 80 % de identidad, tal como al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % o 100 % de identidad con una secuencia de región VL seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 73, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 77 y 69, o

b) como máximo 20, tal como 15, o 10, o 5, 4, 3, 2 o 1 modificaciones de aminoácidos, más preferentemente sustituciones de aminoácidos, tales como sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con una secuencia de región VH seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 73, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 77 y 69.

5

También se desvelan en el presente documento anticuerpos que comprenden:

- a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 73, o
- 10 b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 41, o
- c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 45, o
- 15 d) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 49, o
- e) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 53, o
- f) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 17 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 57, o
- 20 g) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 21 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 61, o
- h) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 25 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 65, o
- 25 i) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 29 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 69, o
- j) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 37 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 77.

30 En una realización el anticuerpo se une al dominio extracelular del factor tisular con una afinidad aparente ( $CE_{50}$ ) de 3,0 nM o menos, tal como 0,50 nM o menos, por ejemplo 0,35 nM o menos, tal como 0,20 nM o menos, por ejemplo 0,1 nM o menos, cuando se determina como se describe en el ensayo en el Ejemplo 12.

35 En una realización el anticuerpo se une con células de mamífero que expresan el factor tisular, tales como células A431 transfectadas con una construcción que codifica el factor tisular, preferentemente con una afinidad aparente ( $CE_{50}$ ) de 10 nM o menos, por ejemplo 8 nM o menos, tal como 5 nM o menos, por ejemplo 2 nM o menos, tal como 1 nM o menos, por ejemplo 0,5 nM o menos, tal como 0,3 nM o menos, cuando se determina como se describe en el ensayo en el Ejemplo 13.

40 En otro aspecto o un aspecto alternativo el anticuerpo se conjuga con un resto terapéutico seleccionado del grupo que consiste en taxol; citocalasina B; gramicidina D; bromuro de etidio; emetina; mitomicina; etopósido; tenopósido; vincristina; vinblastina; colchicina; doxorubicina; daunorrubicina; dihidroxiantracindiona; un inhibidor de tubulina tal como maitansina o un análogo o derivado del mismo; mitoxantrona; mitramicina; actinomicina D; 1-deshidrotestosterona; un glucocorticoide; procaína; tetracaína; lidocaína; propranolol; puromicina; calicheamicina o un análogo o derivado del mismo, un antimetabolito tal como metotrexato, 6 mercaptopurina, 6 tioguanina,

45 citarabina, fludarabina, 5 fluorouracilo, decarbazina, hidroxiaurea, asparaginasa, gemcitabina o cladribina; un agente alquilante tal como mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazina, mitomicina C, cisplatino, carboplatino, duocarmicina A, duocarmicina SA, rachelmicina (CC-1065), o un análogo o derivado de los mismos; pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepinas (PDB) o análogos de las mismas; un antibiótico tal como dactinomomicina,

50 bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)); toxina diftérica y moléculas relacionadas tales como cadena A de difteria y fragmentos activos de las mismas y moléculas híbridas, toxina de ricina tal como ricina A o una toxina de cadena A de ricina desglucosilada, toxina del cólera, una toxina de tipo Shiga tal como SLT I, SLT II, SLT IIV, Toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina de tos ferina, toxina del tétanos, inhibidor de proteasa de soja Bowman-Birk, exotoxina de

55 Pseudomonas, alorina, saporina, modeccina, gelatina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* tales como PAPI, PAPII y PAP S, inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y toxinas de enomicina; ribonucleasa (RNasa); DNasa I, enterotoxina A estafilocócica; proteína antivírica del ombú; toxina de difteria; y endotoxina de Pseudomonas. En una realización alternativa

60 adicional el anticuerpo se conjuga con un resto citotóxico seleccionado del grupo que consiste en dolastatina, maitansina, calicheamicina, duocarmicina, rachelmicina (CC-1065) o un análogo, derivado o profármaco de cualquiera de las mismas.

65 En una realización alternativa adicional, el anticuerpo se conjuga con una citocina seleccionada del grupo que consiste en IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , GM-CSF, CD40L, Ligando Flt3, factor de células madre, ancestim y TNF $\alpha$ .

En una realización alternativa adicional, el anticuerpo se conjuga con un radioisótopo.

En una realización el anticuerpo es capaz de inducir citotoxicidad mediante internalización del anticuerpo acoplado con una toxina en A431, BxPC3 o MDA-MB-23 como se describe en el Ejemplo 15.

5 En una realización el anticuerpo induce citotoxicidad por internalización como se describe en el Ejemplo 15, con un valor de  $CE_{50}$  entre  $9 \times 10^{-5}$  y  $4 \times 10^{-4}$   $\mu\text{g/ml}$  en células A431.

10 En una realización la preparación del conjugado farmacológico de anticuerpo da como resultado menos del 2 %, tal como menos del 1,5 %, o menos del 1 %, o menos del 0,5 % de fármaco no conjugado cuando se determina como se describe en el Ejemplo 16.

15 En una realización la preparación del conjugado farmacológico de anticuerpo da como resultado menos del 10 %, tal como menos del 8 %, o menos del 7 %, o menos del 6 % o menos del 5,5 % de agregados cuando se determina como se describe en el Ejemplo 16.

20 En una realización la preparación del conjugado farmacológico de anticuerpo da como resultado menos del 1 %, tal como menos del 0,5 %, o menos del 0,25 %, o menos del 0,2 % de endotoxinas cuando se determina como se describe en el Ejemplo 16.

25 En una realización la preparación del conjugado farmacológico de anticuerpo da como resultado una concentración de conjugado farmacológico de anticuerpo en el intervalo de 1-100 mg/ml, tal como en el intervalo de 2-50 mg/ml, o en el intervalo de 5-25 mg/ml, o en el intervalo de 5-15 mg/ml, o en el intervalo de 7,5-15 mg/ml, o en el intervalo de 8-12 mg/ml, o en el intervalo de 9-11 mg/ml cuando se determina como se describe en el Ejemplo 16.

30 En una realización el conjugado farmacológico de anticuerpo se une con el dominio extracelular del factor tisular con una afinidad aparente ( $CE_{50}$ ) de 600 ng/ml o menos, tal como 550 ng/ml o menos, o 500 ng/ml o menos, tal como con un valor de  $CE_{50}$  en el intervalo de 200-600 ng/ml, por ejemplo un valor de  $CE_{50}$  en el intervalo de 300-600 ng/ml, o un valor de  $CE_{50}$  en el intervalo de 350-550 ng/ml, o un valor de  $CE_{50}$  en el intervalo de 400-500 ng/ml, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 17.

En una realización el conjugado farmacológico de anticuerpo induce citotoxicidad por internalización como se describe en el Ejemplo 18, con un valor de  $CE_{50}$  entre 1 y 100 ng/ml en células A431.

35 En una realización el conjugado farmacológico de anticuerpo induce citotoxicidad por internalización como se describe en el Ejemplo 18, con un valor de  $CE_{50}$  entre 0,5 y 20 ng/ml en células HPAF-II.

40 En una realización el conjugado farmacológico de anticuerpo induce citotoxicidad por internalización como se describe en el Ejemplo 18, con un valor de  $CE_{50}$  entre 0,5 y 500 ng/ml, tal como entre 0,5 y 20 ng/ml en células NCI-H441.

45 En una realización el conjugado farmacológico de anticuerpo induce citotoxicidad por internalización como se describe en el Ejemplo 18, por ejemplo en células tumorales, que expresan más de 200.000 moléculas de factor tisular por célula, tal como entre 200.000 y 1.000.000 de moléculas de factor tisular por célula, por ejemplo entre 200.000 y 500.000 moléculas de factor tisular por célula. El valor de  $CE_{50}$  puede ser en una realización entre 0,1 y 100 ng/ml.

50 En una realización el conjugado farmacológico de anticuerpo induce citotoxicidad por internalización como se describe en el Ejemplo 18, por ejemplo, en células tumorales, que expresan más de 20.000 moléculas de factor tisular por célula, tal como entre 20.000 y 200.000 moléculas de factor tisular por célula. El valor de  $CE_{50}$  puede ser en una realización de entre 0,5 y 500 ng/ml, tal como entre 0,5 y 20 ng/ml.

En una realización el conjugado farmacológico de anticuerpo inhibe el crecimiento tumoral como se describe en el Ejemplo 19.

55 En una realización el conjugado farmacológico de anticuerpo inhibe el crecimiento tumoral de una línea celular que expresan más de 1.000 moléculas de factor tisular por célula, tal como más de 10.000 moléculas de factor tisular por células, por ejemplo más de 100.000 moléculas de factor tisular por célula, o tal como entre 1.000 y 20.000 moléculas de factor tisular por célula, o entre 20.000 y 200.000 moléculas de factor tisular por célula, o entre 200.000 y 500.000 moléculas de factor tisular por célula, o entre 200.000 y 1.000.000 de moléculas de factor tisular por célula, cuando el crecimiento tumoral se determina como se describe en el Ejemplo 19.

60 En una realización el conjugado farmacológico de anticuerpo es estable a  $-65^{\circ}\text{C}$  durante al menos tres meses, donde la estabilidad se refiere a que al menos el 95 % del conjugado farmacológico de anticuerpo está presente como moléculas monoméricas cuando se determina como se describe en el Ejemplo 20.

65

En una realización el conjugado farmacológico de anticuerpo es estable a 5 °C durante al menos tres meses, donde estable se refiere a que al menos el 95 % del conjugado farmacológico de anticuerpo está presente como moléculas monoméricas cuando se determina como se describe en el Ejemplo 20.

5 En otro aspecto la invención proporciona una composición farmacológica que comprende el conjugado farmacológico de anticuerpo como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores. En una realización la composición farmacológica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En otro aspecto la invención proporciona el conjugado farmacológico de anticuerpo como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores para su uso como un medicamento.

En otro aspecto la invención proporciona el conjugado farmacológico de anticuerpo como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores para uso en el tratamiento de un trastorno.

15 En otro aspecto la invención proporciona el conjugado farmacológico de anticuerpo como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores para uso en el tratamiento de inflamación.

En otro aspecto la invención proporciona el conjugado farmacológico de anticuerpo como se define en cualquiera de las realizaciones anteriores para uso en el tratamiento de cáncer.

20 En una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en tumores del sistema nervioso central, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, tal como NSCLC, cáncer de mama, específicamente cáncer de mama triple negativo, cáncer esofágico, cáncer gástrico o de estómago, cáncer de hígado y biliar, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer endometrial, cáncer ovárico, melanoma maligno, sarcoma, tumores de origen primario desconocido, cáncer de médula ósea, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica y linfoma no de Hodgkin, cáncer de piel, glioma, cáncer del cerebro, útero, leucemia mieloide aguda y recto.

30 En una realización el cáncer es cáncer pancreático.

En una realización el cáncer es cáncer colorrectal.

En una realización el cáncer es cáncer ovárico.

35 En una realización el cáncer es cáncer de mama.

En una realización el cáncer es cáncer de próstata.

En una realización el cáncer es cáncer de vejiga.

40 En una realización, el cáncer es un cáncer que es sensible a tratamiento con un inhibidor de tubulina.

45 En otro aspecto la invención proporciona el conjugado farmacológico de anticuerpo de una cualquiera de las realizaciones anteriores, donde el medicamento es para tratamiento de cáncer en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como un agente quimioterapéutico.

En otro aspecto la invención proporciona el uso del conjugado farmacológico de anticuerpo de una cualquiera de las realizaciones anteriores para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer. En una realización, el cáncer puede seleccionarse de uno cualquiera de los cánceres descritos anteriormente.

50 En otro aspecto la invención proporciona un método para inducir muerte celular, o inhibir el crecimiento y/o la proliferación de una célula tumoral que expresa un factor tisular, que comprende la administración, a un individuo que lo necesite, de una cantidad eficaz del conjugado farmacológico de anticuerpo de cualquiera de las realizaciones anteriores.

55 En otro aspecto la invención proporciona un método de tratamiento de cualquiera de las enfermedades de cáncer anteriores mediante la administración a un individuo que lo necesita, de una cantidad eficaz del conjugado farmacológico de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores. En una realización el conjugado farmacológico de anticuerpo se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tal como un agente quimioterapéutico.

60 como un agente quimioterapéutico.

#### Anticuerpo

65 La presente invención se refiere a conjugados farmacológicos de anticuerpo anti-FT, que comprende por lo tanto un anticuerpo y un fármaco, que pueden conjugarse en particular entre sí mediante un enlazador.

Los anticuerpos pueden prepararse por técnicas recombinantes bien conocidas usando sistemas de vectores de expresión bien conocidos y células hospedadoras. En una realización los anticuerpos se preparan en una célula CHO usando el sistema de vector de expresión GS como se desvela en De la Cruz Edmunds *et al.*, 2006, Molecular Biotechnology 34:179-190, documentos EP216846, US5981216, WO 87/04462, EP323997, US5591639, US5658759, EP338841, US5879936 y US5891693.

Después de aislar y purificar los anticuerpos del medio celular usando técnicas bien conocidas, estos se conjugan con la auristatina mediante un enlazador como se desvela adicionalmente posteriormente.

Pueden producirse anticuerpos monoclonales de la presente invención, por ejemplo mediante el método de hibridoma descrito por primera vez en Kohler *et al.*, Nature 256, 495 (1975), o pueden producirse mediante métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson *et al.*, Nature 352, 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991). Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales de cualquier fuente adecuada. Por lo tanto, por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales de hibridomas preparados a partir de linfocitos B esplénicos murinos obtenidos de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo en forma de células que expresan el antígeno en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. También pueden obtenerse anticuerpos monoclonales de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de seres humanos o mamíferos no humanos inmunizados tales como ratas, perros, primates, etc.

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra factor tisular pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en el presente documento ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en el presente documento "ratones transgénicos".

El ratón HuMAb contiene un minilocus de gen de inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y ligera  $\kappa$  humanas no reordenadas, junto con mutaciones diana que inactivan los loci de cadena  $\mu$  y  $\kappa$  endógenos (Lonberg, N. *et al.*, Nature 368, 856-859 (1994)). En consecuencia, los ratones muestran expresión reducida de IgM o  $\kappa$  de ratón y en respuesta a inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humana introducidos experimentan cambios de clase y mutaciones somáticas para generar anticuerpos monoclonales IgG, $\kappa$  humanos de alta afinidad (Lonberg, N. *et al.* (1994), mencionado anteriormente; revisado en Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. y Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995) y Harding, F. y Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)). La preparación de ratones HuMAb se describe en detalle en Taylor, L. *et al.*, Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. *et al.*, International Immunology 5, 647-656 (1993), Tuailon *et al.*, J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. *et al.*, International Immunology 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. *et al.*, Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Véase también documentos US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.789.650, US 5.877.397, US 5.661.016, US 5.814.318, US 5.874.299, US 5.770.429, US 5.545.807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.

Los ratones HCo7 tienen una alteración JKD en sus genes cadena ligera ( $\kappa$ ) endógenos (como se describe en Chen *et al.*, EMBO J. 12, 821-830 (1993)), una alteración CMD en sus genes de cadena pesada endógenos (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén de cadena ligera  $\kappa$  humana KCo5 (como se describe en Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)), y un transgén de cadena pesada humana HCo7 (como se describe en el documento US 5.770.429).

Los ratones HCo12 tienen una alteración JKD en sus genes de cadena ligera ( $\kappa$ ) endógenos (como se describe en Chen *et al.*, EMBO J. 12, 821-830 (1993)), una alteración CMD en sus genes de cadena pesada endógenos (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424), un transgén de cadena ligera  $\kappa$  humana KCo5 (como se describe en Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)), y un transgén de cadena pesada humana HCo12 (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/14424).

La cepa de ratón transgénica HCo17 (véase también documento US 2010/0077497) se generó por coinyección del inserto de 80 kb de pHC2 (Taylor *et al.* (1994) Int. Immunol., 6:579-591), el inserto de 25 Kb de pVX6, y un fragmento de cromosoma artificial de levadura de ~460 kb del cromosoma ylgH24. Esta línea se designó (HCo17) 25950. La línea (HCo17) 25950 se crió después con ratones que comprendían la mutación CMD (descrita en el Ejemplo 1 de la Publicación de PCT WO 01109187), la mutación JKD (Chen *et al.* (1993) EMBO J 12: 811-820), y el transgén 9272 (KCo5) (Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14:845-851). Los ratones resultantes expresan transgenes de cadena ligera  $\kappa$  y pesada de inmunoglobulina humana en un fondo homocigoto para alteración de los loci de cadena ligera  $\kappa$  y pesada de ratón endógenos.

La cepa de ratón transgénico HCo20 es el resultado de una co-inyección de transgén de cadena pesada de minilocus 30 pHC2, YAC ylgH10 que contiene la región variable de línea germinal (Vh), y la construcción de minilocus pVx6 (descrita en el documento WO09097006). La línea (HCo20) se crió después con ratones que comprendían la mutación CMD (descrita en el Ejemplo 1 de la Publicación de PCT WO 01/09187), la mutación JKD

(Chen *et al.* (1993) EMBO J. 12:811-820) y el transgén 9272 (KC05) (Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14:845-851). Los ratones resultantes expresan 10 transgenes de cadena ligera kappa y pesada de inmunoglobulina humanos en un fondo homocigoto para la alteración de los loci de cadena ligera kappa y pesada de ratón endógenos.

Para generar ratones HuMab con los efectos beneficiosos de la cepa Balb/c, se cruzaron ratones HuMab con ratones KC05 [MIK](Balb) que se generaron por entrecruzamiento de la cepa KC05 (como se describe en Fishwild *et al.* (1996) Nature Biotechnology 14:845-851) con ratones Balb/c de tipo silvestre para generar ratones como se describe en el documento WO09097006. Usando este cruce se crearon híbridos Balb/c para las cepas HCo12, HCo17 y HCo20.

En la cepa de ratón KM, el gen de cadena ligera kappa de ratón endógeno se ha alterado de forma homocigota como se describe en Chen *et al.*, EMBO J. 12, 811-820 (1993) y el gen de cadena pesada de ratón endógeno se ha alterado de forma homocigota como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/09187. Esta cepa de ratón porta un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también porta un transcromosoma de cadena pesada humana compuesto del fragmento hCF de cromosoma 14 (SC20) como se describe en el documento WO 02/43478.

Pueden usarse esplenocitos de estos ratones transgénicos para generar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas. También pueden generarse anticuerpos monoclonales o policlonales humanos de la presente invención, o anticuerpos de la presente invención que se originan de otra especie de forma transgénica mediante la generación de otro mamífero no humano o planta que sea transgénico para la secuencia de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable de los mismos. En relación con la producción transgénica en mamíferos, pueden producirse anticuerpos en, y recuperarse de, la leche de cabras, vacas u otros mamíferos. Véase por ejemplo documentos US 5.827.690, US 5.756.687, US 5.750.172 y US 5.741.957.

Además, pueden generarse anticuerpos humanos de la presente invención o anticuerpos de la presente invención de otra especie mediante tecnologías de tipo presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en fagos, presentación retroviral, presentación ribosómica y otras técnicas, usando técnicas bien conocidas en este campo y las moléculas resultantes pueden someterse a maduración adicional, tal como maduración de afinidad, ya que dichas técnicas se conocen bien en este campo. (Véase por ejemplo Hoogenboom *et al.*, J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (presentación en fago), Vaughan *et al.*, Nature Biotech 14, 309 (1996) (presentación en fago), Hanes y Plutchau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997) (presentación ribosómica), Parmley y Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (presentación en fago), Scott TIBS 17, 241-245 (1992), Cwirla *et al.*, PNAS USA 87, 6378-6382 (1990), Russel *et al.*, Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993), Hogenboom *et al.*, Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992), Chiswell y McCafferty TIBTCEH 10, 80-84 (1992) y documento US 5.733.743). Si se utilizan tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no son humanos, dichos anticuerpos pueden humanizarse.

El anticuerpo de la invención puede ser de cualquier isotipo. La elección de isotipo típicamente estará guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como inducción de ADCC. Son isotipos ejemplares IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Puede usarse cualquiera de las regiones constantes de cadena ligera humana, kappa o lambda. Si se desea, la clase de un anticuerpo anti-FT de la presente invención puede cambiarse por métodos conocidos. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención que fue originalmente IgM puede cambiarse de clase a un anticuerpo IgG de la presente invención. Además, pueden usarse técnicas de cambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo de IgG1 a IgG2. Por lo tanto, la función efectora de los anticuerpos de la presente invención puede cambiarse por intercambio de isotipo a, por ejemplo, un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM para diversos usos terapéuticos. En una realización un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo IgG1, por ejemplo un IgG1,k.

En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo de longitud completa, preferentemente un anticuerpo IgG1, en particular un anticuerpo IgG1,k. Se pretende que la expresión "anticuerpo de longitud completa" se entienda como referente a lo que se conoce en general como un anticuerpo natural, completo, es decir, no un fragmento u otros tipos de anticuerpos donde las cadenas diferentes de un anticuerpo se han reordenado por el hombre para generar un nuevo tipo de anticuerpo (véase por ejemplo Sidhu SS, Nature Biotechnology, 25, 5, 537-538, (2007) que desvela anticuerpos de longitud completa presentados). En otra realización, el anticuerpo de la invención es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo monocatenario.

Los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse, por ejemplo, por fragmentación usando técnicas convencionales, y los fragmentos pueden explorarse por su utilidad de la misma manera que se ha descrito en el presente documento para anticuerpos completos. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab')<sub>2</sub> tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')<sub>2</sub> resultante puede tratarse para reducir enlaces disulfuro para producir fragmentos Fab'. Pueden obtenerse fragmentos Fab tratando un anticuerpo IgG con papaína; pueden obtenerse fragmentos Fab con digestión con pepsina de anticuerpo IgG. También puede producirse un fragmento F(ab') por unión de Fab' descrito anteriormente mediante un enlace de tioéter o un enlace disulfuro. Un fragmento Fab' es un fragmento de anticuerpo obtenido cortando un enlace disulfuro de la región bisagra del F(ab')<sub>2</sub>. Puede obtenerse un fragmento

Fab' tratando un fragmento F(ab')<sub>2</sub> con un agente reductor, tal como ditiotreitól. También pueden generarse fragmentos de anticuerpo mediante expresión de ácidos nucleicos que codifican dichos fragmentos en células recombinantes (véase por ejemplo Evans *et al.*, J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)). Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una parte de un fragmento F(ab')<sub>2</sub> podría incluir secuencias de ADN que codifican el dominio C<sub>H</sub>1 y la región bisagra de la cadena H, seguido de un codón de terminación de la traducción para producir dicha molécula de fragmento de anticuerpo truncada.

Los anticuerpos de la presente invención se desvelan adicionalmente y se caracterizan en el documento WO 2010/066803 (Genmab A/S).

En una realización el anticuerpo anti-FT es un anticuerpo IgG4 estabilizado. Son ejemplos de anticuerpos IgG4 estabilizados adecuados anticuerpos donde se sustituye arginina en la posición 409 en una región constante de cadena pesada de IgG4 humana, que se indica en el índice EU como en Kabat *et al.*, con lisina, treonina, metionina o leucina, preferentemente lisina (descrito en el documento WO2006033386 (Kirin)) y/o donde la región bisagra comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-FT IgG4 estabilizado es un anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde dicha cadena pesada comprende una región constante de IgG4 humana que tiene un resto seleccionado del grupo que consiste en: Lys, Ala, Thr, Met y Leu en la posición correspondiente a 409 y/o un resto seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Val, Gly, Ile y Leu en la posición correspondiente a 405, y donde dicho anticuerpo comprende opcionalmente una o más sustituciones, supresiones y/o inserciones adicionales, pero no comprende una secuencia de Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra. Preferentemente, dicho anticuerpo comprende un resto de Lys o Ala en la posición correspondiente a 409 o la región CH3 del anticuerpo se ha remplazado por la región CH3 de IgG1 humano, de IgG2 humano o de IgG3 humano.

En una realización adicional más, el anticuerpo anti-FT IgG4 estabilizado es un anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde dicha cadena pesada comprende una región constante IgG4 humana que tiene un resto seleccionado del grupo que consiste en: Lys, Ala, Thr, Met y Leu en la posición correspondiente a 409 y/o un resto seleccionado del grupo que consiste en: Ala, Val, Gly, Ile y Leu en la posición correspondiente a 405, y donde dicho anticuerpo comprende opcionalmente una o más sustituciones, supresiones y/o inserciones adicionales y donde dicho anticuerpo comprende una secuencia de Cys-Pro-Pro-Cys en la región de bisagra. Preferentemente, dicho anticuerpo comprende un Lys o Ala en la posición correspondiente a 409 o la región CH3 del anticuerpo se ha reemplazado por la región CH3 de IgG1 humano, de IgG2 humano o de IgG3 humano.

En una realización adicional, el anticuerpo anti-FT es un anticuerpo de un tipo distinto de IgG4, por ejemplo IgG1, IgG2 o IgG3 que se ha mutado de modo que la capacidad para mediar en funciones efectoras, tales como ADCC, se ha reducido o incluso se ha eliminado. Dichas mutaciones se han descrito, por ejemplo en Dall'Acqua WF *et al.*, J Immunol. 177(2):1129-1138 (2006) y Hezareh M, J Virol.;75(24):12161-12168 (2001).

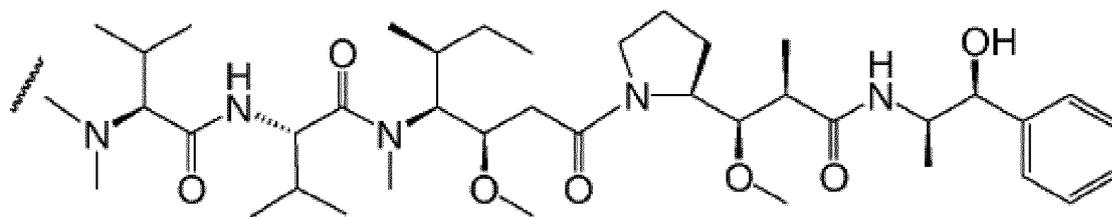
#### 40 Conjugados

La presente invención proporciona un conjugado farmacológico de anticuerpo anti-FT.

En un aspecto los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti-FT de la presente invención comprenden un anticuerpo anti-FT como se desvela en el presente documento conjugado con auristatinas o análogos y derivados peptídicos de auristatina (documentos US5635483; US5780588). Se ha mostrado que las auristatinas interfieren con dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke *et al.* (2001) Antimicrob. Agents y Chemother. 45(12): 3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (documento US5663149) y anti-fúngica (Pettit *et al.*, (1998) Antimicrob. Agents y Chemother. 42:2961-2965). El resto farmacológico de auristatina puede unirse con el anticuerpo mediante un enlazador, a través del extremo N (amino) terminal o el extremo C (terminal) del resto farmacológico peptídico.

Las realizaciones de auristatina ejemplares incluyen los restos farmacológicos de monometil auristatina ligados al extremo N-terminal DE y DF, desvelados en Senter *et al.*, Proceedings of the American Association for Cancer Research. Volumen 45, número de resumen 623, presentado el 28 de marzo de 2004 y descrito en el documento US 2005/0238649).

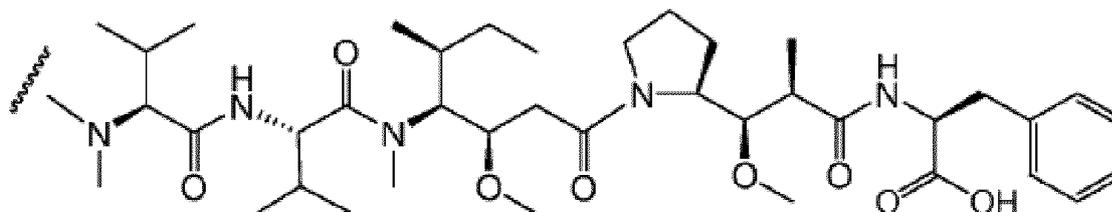
Una realización de auristatina ejemplar es MMAE (monometil auristatina E), donde la línea ondulada indica la unión covalente con el enlazador (L) de un conjugado farmacológico de anticuerpo:



MMAE

Otra realización de auristatina ejemplar es MMAF (monometil auristatina F), donde la línea ondulada indica la unión covalente con un enlazador (L) de un conjugado farmacológico de anticuerpo (documento US2005/0238649):

5



MMAF

Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti-FT de acuerdo con la invención comprenden una unidad enlazadora entre la unidad farmacológica citostática o citotóxica y la unidad de anticuerpo. En algunas realizaciones, el enlazador es escindible en condiciones intracelulares, de modo que la escisión del enlazador libera la unidad farmacológica del anticuerpo en el ambiente intracelular. En otra realización más, la unidad enlazadora no es escindible y el fármaco se libera por ejemplo por degradación de anticuerpo. En algunas realizaciones, el enlazador es escindible por un agente escindible que está presente en el ambiente intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador de peptidilo que se escinde por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo, pero sin limitación, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunas realizaciones, el enlazador de peptidilo es de al menos dos aminoácidos de longitud o al menos tres aminoácidos de longitud. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todas las cuales se sabe que hidrolizan derivados farmacológicos dipeptídicos que dan como resultado la liberación de fármaco activo dentro de las células diana (véase por ejemplo Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). En una realización específica, el enlazador de peptidilo escindible por una proteasa intracelular es un Val-Cit (valina-citrulina) o un enlazador Phe-Lys (fenilalanina-lisina) (véase por ejemplo documento US6214345, que describe la síntesis de doxorubicina con el enlazador Val-Cit y diferentes ejemplos de enlazadores Phe-Lys). Los ejemplos de las estructuras de un enlazador Val-Cit y un enlazador Phe-Lys incluyen pero sin limitación MC-vc-PAB descrito posteriormente, MC-vc-GABA, MC-Phe-Lys-PAB o MC-Phe-Lys-GABA, donde MC es una abreviatura de maleimido caproílo, vc es una abreviatura de Val-Cit, PAB es una abreviatura de *p*-aminobenzilcarbamato y GABA es una abreviatura de ácido  $\gamma$ -aminobutírico. Una ventaja del uso de liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente se atenúa típicamente cuando se conjuga y las estabildades en suero de los conjugados son típicamente altas.

10

15

20

25

30

35

40

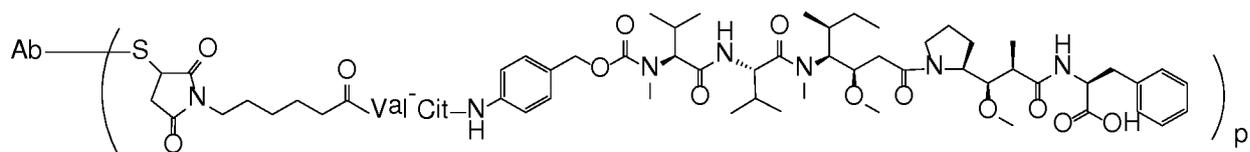
En otra realización más, la unidad enlazadora no es escindible y el fármaco se libera por degradación de anticuerpo (véase documento US 2005/0238649). Típicamente, dicho enlazador no es sustancialmente sensible al ambiente extracelular. Como se usa en el presente documento, "no es sustancialmente sensible al ambiente extracelular" en el contexto de un enlazador significa que no más del 20 %, típicamente no más de aproximadamente el 15 %, más típicamente no más de aproximadamente el 10 %, y aún más típicamente no más de aproximadamente el 5 %, no más de aproximadamente el 3 %, o no más de aproximadamente el 1 % de los enlazadores, en una muestra de compuesto de conjugado farmacológico de anticuerpo, se escinden cuando el compuesto de conjugado farmacológico de anticuerpo se presenta en un ambiente extracelular (por ejemplo plasma). Puede determinarse si un es un enlazador no es sustancialmente sensible al ambiente extracelular por ejemplo incubando el compuesto de conjugado farmacológico de anticuerpo con plasma durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y cuantificando después la cantidad de fármaco libre presente en el plasma.

45

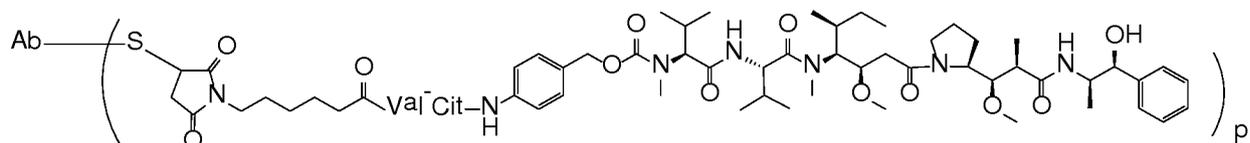
Realizaciones ejemplares adicionales que comprenden MMAE o MMAF y diversos componentes enlazadores tienen las siguientes estructuras (donde Ab significa anticuerpo y p, que representa la carga farmacológica (o el número promedio de fármacos citostáticos o citotóxicos por molécula de anticuerpo), es de 1 a aproximadamente 8, por ejemplo p puede ser de 4-6, tal como de 3-5, o p puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8).

50

Los ejemplos donde un enlazador escindible se combina con una auristatina incluyen MC-vc-PAB-MMAF (también designado vcMMAF) y MC-vc-PAB-MMAE (también designado vcMMAE), donde MC es una abreviatura de maleimido caproílo, vc es una abreviatura del enlazador basado en Val-Cit (valina-citrulina), y PAB es una abreviatura de *p*-aminobenzilcarbamato:

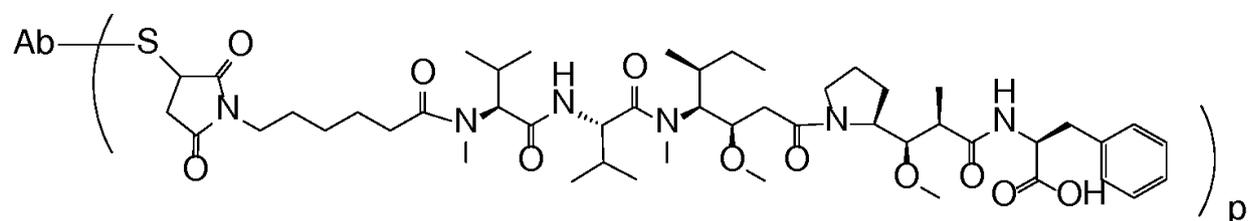


Ab-MC-vc-PAB-MMAF (vcMMAF)



Ab-MC-vc-PAB-MMAE (vcMMAE)

- 5 Otros ejemplos incluyen auristatinas combinadas con un enlazador no escindible, tal como mcMMAF (mc (MC es igual que mc en este contexto) es una abreviatura de maleimido caproílo):



Ab-MC-MMAF (mcMMAF)

- 10 Las carga de fármaco citostático o citotóxico está representada por p y es el número promedio de restos farmacológicos citostáticos por anticuerpo en una molécula (también designado como la relación de fármaco con respecto a anticuerpo, DAR). La carga de fármaco citostático o citotóxico puede variar de 1 a 20 restos farmacológicos por anticuerpo y puede producirse en aminoácidos con grupos funcionales útiles tales como, pero sin limitación, grupos amino o sulfhidrilo, como en lisina o cisteína.

- 15 Dependiendo del modo de conjugación, p puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo, por ejemplo, cuando la unión es un grupo sulfhidrilo, como en la presente invención. En general, los anticuerpos no contienen muchos grupos sulfhidrilo (grupos tiol de cisteína libres y reactivos) que pueden estar unidos con un resto farmacológico, ya que la mayoría de restos tiol de cisteína en anticuerpos existen como enlaces disulfuro. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, un anticuerpo puede reducirse con un agente reductor tal como ditioneitol (DTT) o tricarbonyltilfosfina (TCEP), en condiciones parcial o completamente reductoras, para generar restos de sulfhidrilo reactivos. En ciertas realizaciones, la carga farmacológica para un ADC de la invención varía de 1 a aproximadamente 8, por ejemplo p puede ser de 4-6, tal como de 3-5, o p puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, ya que un máximo de 8 restos de sulfhidrilo se hacen disponibles después de reducción (parcial) del anticuerpo (hay 8 cisteínas implicadas en el enlace disulfuro intercatenario).

- 20 En una realización, el resto enlazador farmacológico es vcMMAE. El resto enlazador farmacológico vcMMAE y los métodos de conjugación se desvelan en los documentos WO2004010957, US7659241, US7829531, US7851437 y US 11/833.028 (Seattle Genetics, Inc.) y el resto enlazador farmacológico vcMMAE se une con los anticuerpos anti FT en las cisteínas usando un método similar a los desvelados en los mismos.

- 25 En una realización, el resto enlazador farmacológico es mcMMAF. El resto enlazador farmacológico mcMMAF y métodos de conjugación se desvelan en los documentos US7498298, US 11/833.954 y WO2005081711 (Seattle Genetics, Inc.) y el resto enlazador farmacológico mcMMAF se une a los anticuerpos anti FT en las cisteínas usando un método similar a los desvelados en los mismos.

En una realización, el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT es HuMab-TF-011-vcMMAE.

- 30 También se desvela en el presente documento el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT HuMab-TF-098-vcMMAE.

También se desvela en el presente documento el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT HuMab-TF-111-vcMMAE.

También se desvela en el presente documento el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT HuMab-TF-114-vcMMAE.

En una realización, el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT es HuMab-TF-011-mcMMAF.

5 También se desvela en el presente documento el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT HuMab-TF-098-mcMMAF.

10 También se desvela en el presente documento el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT HuMab-TF-111-mcMMAF.

También se desvela en el presente documento el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT HuMab-TF-114-mcMMAF.

15 En una realización alternativa el anticuerpo anti FT se conjuga con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco quimioterapéutico, una citocina, un inmunosupresor o un radioisótopo. Dichos conjugados se denominan en el presente documento “inmunoconjugados”. Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan “inmunotoxinas”.

20 Una citotoxina o un agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (por ejemplo, que destruya) células. Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados de la presente invención incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi-antracindiona, maitansina o un análogo o derivado de los mismos, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina; calicheamicina o análogos o derivados de la misma; antimetabolitos (tales como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina, hidroxiurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina), agentes alquilantes (tales como mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tales como carboplatino; así como duocarmicina A, duocarmicina SA, CC-1065 (también conocido como rachelmicina), o análogos o derivados de CC-1065), dolastatina, pirrolo [2,1-c] [1,4] benzodiazepinas (PDB) o análogos de las mismas, antibióticos (tales como dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, daunorubicina (anteriormente daunomicina), doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC)), agentes antimetabólicos (por ejemplo, inhibidores de tubulina), tales como toxina diftérica y moléculas relacionadas (tales como cadena A de difteria y fragmentos activos de la misma y moléculas híbridas); toxina ricina (tal como ricina A o toxina de cadena A de ricina desglucosilada), toxina del cólera, una toxina de tipo Shiga (SLT-1, SLT-II, SLT-IV), toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina de tos ferina, toxina del tétanos, inhibidor de proteasa de soja Bowman-Birk, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modeccina, gelanina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcuma, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina. Otras moléculas conjugadas adecuadas incluyen péptidos antimicrobianos/lífticos tales como CLIP, Magainina 2, melitina, Cecropina y P18; ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina A estafilocócica, proteína antivírica del ombú, toxina de difteria y endotoxina de *Pseudomonas*. Véase, por ejemplo, Pastan *et al.*, Cell 47, 641 (1986) y Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994). Los agentes terapéuticos que pueden administrarse en combinación con conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención como se describe en otra parte del presente documento, tales como, por ejemplo, citocinas o quimioterápicos antineoplásicos, también son candidatos para restos terapéuticos útiles para conjugación con un anticuerpo desvelado en la presente invención.

50 En otra realización alternativa, un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT desvelado en la presente invención comprende un ácido nucleico conjugado o molécula asociada a ácido nucleico. En una de dichas realizaciones, el ácido nucleico conjugado es una ribonucleasa citotóxica, un ácido nucleico antisentido, una molécula de ARN inhibidora (por ejemplo, una molécula de ARNip) o un ácido nucleico inmunostimulante (por ejemplo, una molécula de ADN que contiene motivo CpG inmunostimulante). En otra realización alternativa, un anticuerpo anti FT de la invención se conjuga con un aptámero o una ribozima en lugar de una auristatina o un análogo o derivado peptídico funcional de la misma.

60 En otra realización alternativa, se proporcionan conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT que comprenden uno o más aminoácidos radiomarcados. Un anticuerpo anti FT radiomarcado puede usarse para fines tanto de diagnóstico como terapéuticos (la conjugación con moléculas radiomarcadas es otro elemento posible). Los ejemplos no limitantes de marcadores para polipéptidos incluyen <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc y <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I y <sup>186</sup>Re. Se conocen en la técnica métodos para preparar aminoácidos radiomarcados y derivados peptídicos relacionados (véase por ejemplo, Junghans *et al.*, en Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)) y documentos US 4.681.581, US 4.735.210, US 5.101.827, US 5.102.990 (US RE35.500), US 5.648.471 y US 5.697.902. Por ejemplo, un radioisótopo puede conjugarse por un método de cloramina T.

- En una realización, el anticuerpo se conjuga con un radioisótopo o con un quelado que contiene radioisótopo. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con un enlazador quelante, por ejemplo, DOTA, DTPA o tiuxetano, que permite que el anticuerpo forme complejo con un radioisótopo. El anticuerpo puede también o como alternativa comprender o conjugarse con uno o más aminoácidos radiomarcados u otra molécula radiomarcada. Puede usarse un anticuerpo anti FT radiomarcado para fines tanto de diagnóstico como terapéuticos. Los ejemplos no limitantes de radioisótopos incluyen  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{213}\text{Bs}$ ,  $^{225}\text{Ac}$  y  $^{227}\text{Th}$ .
- Los anticuerpos anti FT también pueden modificarse químicamente por conjugación covalente con un polímero para, por ejemplo, aumentar su semivida en circulación. Se ilustran polímeros ejemplares, y métodos para unirlos con péptidos, por ejemplo en los documentos US 4.766.106, US 4.179.337, US 4.495.285 y US 4.609.546. Los polímeros adicionales incluyen polioles polioxietilados y polietilenglicol (PEG) (por ejemplo, un PEG con un peso molecular de entre aproximadamente 1.000 y aproximadamente 40.000, tal como entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 20.000). Esto puede usarse, por ejemplo, si el anticuerpo anti FT es un fragmento.
- Puede emplearse cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo anti FT desvelado en la presente invención con la molécula o las moléculas conjugadas, tales como las descritas anteriormente, incluyendo los métodos descritos en Hunter *et al.*, Nature. 144, 945 (1962), David *et al.*, Biochemistry 13, 1014 (1974), Pain *et al.*, J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981) y Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982). Dichos anticuerpos pueden producirse conjugando químicamente el otro resto con el lado N terminal o el lado C terminal del anticuerpo anti FT o fragmento del mismo (por ejemplo, una cadena H o L de anticuerpo anti FT) (véase, por ejemplo, Antibody Engineering Handbook, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)). Dichos derivados de anticuerpos conjugados también pueden generarse por conjugación en restos internos o azúcares, cuando sea apropiado.
- Los agentes pueden acoplarse directa o indirectamente con un anticuerpo anti FT desvelado en la presente invención. Un ejemplo de acoplamiento indirecto de un segundo agente es acoplamiento mediante un resto espaciador con restos de cisteína o lisina en el anticuerpo. En una realización, un anticuerpo anti FT se conjuga, mediante un espaciador o enlazador, con una molécula de profármaco que puede activarse *in vivo* a un fármaco terapéutico. Después de la administración, los espaciadores o enlazadores se escinden por enzimas asociadas a células tumorales u otras condiciones específicas de tumor, por las que se forma el fármaco activo. Se describen ejemplos de dichas tecnologías de profármaco y enlazadores en los documentos WO02083180, WO2004043493, WO2007018431, WO2007089149, WO2009017394 y WO201062171 de Syntarga BV, *et al.* También pueden encontrarse análogos de duocarmicina y tecnología de profármaco-anticuerpo adecuados en la Patente de Estados Unidos n.º 6.989.452 (Medarex).
- En una realización, el anticuerpo anti FT de la presente invención se une a un enlazador quelante, por ejemplo tiuxetano, que permite que el anticuerpo se conjugue con un radioisótopo.
- También se desvela en el presente documento un vector de expresión que codifica un anticuerpo de la invención. Por ejemplo el anticuerpo anti FT de la presente invención se conjuga con un resto terapéutico diferente de una auristatina o un análogo o derivado peptídico funcional de la misma. Dichos vectores de expresión pueden usarse en una realización para expresar el anticuerpo anti FT de la presente invención que puede entonces conjugarse posteriormente con un resto como se describe en el presente documento.
- También se desvela en el presente documento un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1-4, 5-8, 33-36, 37-40, 41-44, 45-48, 73-76 y 77-80.
- También se desvela en el presente documento un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos de VH seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 1, 5, 37 y 33.
- También se desvela en el presente documento un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos de CDR3 de VH seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO 4, 8, 40 y 36.
- También se desvela en el presente documento un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos de VL seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 41, 45, 77 y 73.
- También se desvela en el presente documento un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una o más de las secuencias de aminoácidos de CDR3 de VL seleccionadas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 44, 48, 80 y 76
- También se desvela en el presente documento un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica variantes de una o más de las secuencias de aminoácidos anteriores, teniendo dichas variantes al

menos 25 modificaciones de aminoácidos, tal como 20, tal como como máximo 15, 14, 13, 12 u 11 modificaciones de aminoácidos, tales como 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 modificaciones de aminoácidos, tales como supresiones o inserciones, preferentemente sustituciones, tales como sustituciones conservativas o al menos 80 % de identidad con cualquiera de dichas secuencias, tal como al menos 85 % de identidad o 90 % de identidad o 95 % de identidad, tal como 96 % de identidad o 97 % de identidad o 98 % de identidad o 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriormente mencionadas.

También se desvela en el presente documento un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una cadena ligera, una cadena pesada o cadenas tanto ligeras como pesadas de un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo humano.

Dichos vectores de expresión pueden usarse para producción recombinante de anticuerpos de la invención.

Un vector de expresión en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector adecuado, incluyendo vectores cromosómicos, no cromosómicos y de ácido nucleico sintético (una secuencia de ácido nucleico que comprende un conjunto adecuado de elementos de control de la expresión). Los ejemplos de dichos vectores incluyen derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, y vectores de ácido nucleico vírico (ARN o ADN). En una realización, un ácido nucleico que codifica anticuerpo anti FT está comprendido en un vector de ADN o ARN desnudo, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe, por ejemplo, en Sykes y Johnston, *Nat Biotech* 17, 355-59 (1997)), un vector de ácido nucleico compactado (como se describe por ejemplo en los documentos US 6.077.835 y/o WO 00/70087), un vector plasmídico tal como pBR322, pUC 19/18 o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo "midge" (como se describe por ejemplo en Schakowski *et al.*, *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), o como una construcción de vector de ácido nucleico precipitado, tal como una construcción precipitada con CaPO<sub>4</sub> (como se describe por ejemplo en el documento WO 00/46147, Benvenisty y Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler *et al.*, *Cell* 14, 725 (1978), y Coraro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603 (1981)). Dichos vectores de ácido nucleico y el uso de los mismos se conocen bien en la técnica (véanse, por ejemplo, documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

También se desvela en el presente documento que el vector es adecuado para expresión del anticuerpo anti FT en una célula bacteriana. Los ejemplos de dichos vectores incluyen vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke y Shuster, *J Biol Chem* 264, 5503-5509 (1989), vectores pET (Novagen, Madison WI) y similares).

Un vector de expresión puede ser también o como alternativa un vector adecuado para expresión en un sistema de levadura. Puede emplearse cualquier vector adecuado para expresión en un sistema de levadura. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden promotores constitutivos o inducibles tales como factor alfa, alcohol oxidasa y PGH (revisado en: F. Ausubel *et al.*, Ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley InterScience Nueva York (1987)), y Grant *et al.*, *Methods in Enzymol* 153, 516-544 (1987)).

Un ácido nucleico y/o vector también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de secreción/localización, que puede dirigirse a un polipéptido, tal como una cadena polipeptídica naciente, al espacio periplásmico o al medio de cultivo celular. Dichas secuencias se conocen en la técnica, e incluyen péptidos líder o señal de secreción, secuencias de dirección a orgánulos (por ejemplo, secuencias de localización nuclear, señales de conservación en el RE, secuencias de tránsito mitocondrial, secuencias de tránsito de cloroplastos), secuencias de localización/anclaje de membrana (por ejemplo, secuencias de transferencia de terminación, secuencias de anclaje de GPI), y similares.

En un vector de expresión desvelado en el presente documento, los ácidos nucleicos que codifican anticuerpo anti FT pueden comprender o asociarse con cualquier promotor adecuado, potenciador y otros elementos facilitadores de la expresión. Los ejemplos de dichos elementos incluyen promotores de expresión fuertes (por ejemplo, promotor/potenciador de IE de CMV humano así como promotores de VSR, SV40, SL3-3, MMTV y LTR del VIH), secuencias de terminación de poli(A) eficaces, un origen de replicación para producto plasmídico en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como marcador seleccionable y/o un sitio de clonación conveniente (por ejemplo, un polienlazador). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible a diferencia de un promotor constitutivo tal como IE de CMV (el experto en la materia reconocerá que dichos términos son de hecho descriptores de un grado de expresión génica en ciertas condiciones).

También se desvela en el presente documento que el vector de expresión que codifica anticuerpo anti FT puede situarse en y/o suministrarse a la célula hospedadora o el animal hospedador mediante un vector vírico.

También se desvela en el presente documento una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante, tal como un transfectoma, que produce un anticuerpo anti FT de la invención como se define en el presente documento o una molécula biespecífica de la invención como se define en el presente documento. Los ejemplos de células hospedadoras incluyen células de levadura, bacterianas y de mamífero, tales como células CHO o HEK. Por ejemplo, en una realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico

integrado de forma estable en el genoma celular que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo anti FT de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado, tal como un plásmido, cósmido, fagémido o elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica la expresión de un anticuerpo anti FT de la invención.

5 También se desvela en el presente documento un hibridoma que produce un anticuerpo de la invención como se define en el presente documento. En un aspecto adicional más, la invención se refiere a un animal no humano transgénico que comprende ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada humana y una cadena ligera humana, donde el animal o la planta produce un anticuerpo de la invención. La generación de dichos hibridomas y animales transgénicos se ha descrito anteriormente.

También se desvela en el presente documento un método para producir un anticuerpo anti FT de la invención, comprendiendo dicho método las etapas de

- 15 a) cultivar un hibridoma o una célula hospedadora de la invención como se ha descrito anteriormente en el presente documento y  
 b) purificar el anticuerpo de la invención a partir del medio de cultivo y opcionalmente  
 c) transformar el anticuerpo anti FT en un ADC.

## 20 Composición farmacéutica

Tras purificar los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT estos pueden formularse en composiciones farmacéuticas usando vehículos o excipientes farmacéuticos bien conocidos.

25 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las desveladas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

30 Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocidos deberían ser adecuados para el conjugado farmacológico de anticuerpo de la presente invención y el modo de administración elegido. La conveniencia de vehículos y otros componentes de composiciones farmacéuticas se determina basándose en la falta de impacto negativo significativo en las propiedades biológicas deseadas del compuesto elegido o la composición farmacéutica de la presente invención (por ejemplo, una influencia menos que sustancial (10 % o menos de inhibición relativa, 5 % o menos de inhibición relativa, etc.)) en la unión a antígeno.

35 Una composición farmacéutica de la presente invención también puede incluir diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizadores (por ejemplo, azúcares o aminoácidos sin proteínas), conservantes, fijadores tisulares, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para inclusión en una composición farmacéutica.

40 Las células cancerosas que sobreexpresan FT pueden ser dianas particularmente buenas para los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la invención, ya que pueden unirse más anticuerpos por célula. Por lo tanto, en una realización, un paciente de cáncer para tratar con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la invención es un paciente, por ejemplo un paciente de cáncer pancreático, cáncer de pulmón o cáncer colorrectal al que se ha diagnosticado una o más mutaciones en K-ras y/o una o más mutaciones en p53 en sus células tumorales. La expresión de FT está bajo el control de dos acontecimientos transformantes importantes que conducen la progresión de enfermedad (activación de oncogén de K-ras e inactivación del supresor de tumor p53), de una manera dependiente de la proteína quinasa activada por mitógeno/MEK (MAPK) y fosfatidilinositol 3'-quinasa (PI3K) (Yu *et al.* (2005) Blood 105: 1734).

45 Los niveles de dosificación reales del conjugado farmacológico de anticuerpo en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del conjugado farmacológico de anticuerpo que es eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o la amida de las mismas, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de secreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y el historial médico previo del paciente que se trate, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

50 La composición farmacéutica puede administrarse por cualquier vía y modo adecuados. Se conocen bien en la técnica vías adecuadas de administración de un conjugado farmacológico de anticuerpo de la presente invención y pueden seleccionarse por los expertos habituales en la materia.

En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía parenteral.

Las expresiones “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral” como se usan en el presente documento significa modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, habitualmente por inyección, e incluyen inyección e infusión epidérmica, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, intratendinosa, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracraneal, intratorácica, epidural e intraesternal.

10 En una realización la composición farmacéutica se administra por inyección o infusión intravenosa o subcutánea.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes retardantes de la absorción adecuados, y similares que son fisiológicamente compatibles con el conjugado farmacológico de anticuerpo de la presente invención.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, etanol, dextrosa, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón y aceite de sésamo, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma de tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como etil oleato y/o diversos tampones. Otros vehículos se conocen bien en las técnicas farmacéuticas.

25 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 dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

30 Puede mantenerse la fluidez apropiada, 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 mediante el uso de tensioactivos.

35 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender antioxidantes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propil galato, alfa tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender agentes de isotonicidad, tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol, glicerol o cloruro sódico en las composiciones.

45 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener uno o más adyuvantes apropiados para la vía elegida de administración tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de dispersión, conservantes o tampones, que pueden potenciar la vida útil o eficacia de la composición farmacéutica. El conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención puede prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Dichos vehículos pueden incluir gelatina, gliceril monoestearato, gliceril diestearato, polímeros biodegradables, biocompatibles tales como etilen vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico solos o con una cera, u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los expertos en la materia conocen en general métodos para la preparación de dichas formulaciones. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

50 En una realización, el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención puede formularse para asegurar una distribución apropiada *in vivo*. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para administración parenteral incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, se contempla uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

65

Las composiciones farmacéuticas para inyección deben ser típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración farmacológica. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión acuoso o no acuoso que contenga por ejemplo agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como etil oleato. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como glicerol, manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Puede proporcionarse absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes, por ejemplo como se ha enumerado anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración de esterilización. En general, se preparan dispersiones incorporando el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos, por ejemplo de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, son ejemplos de métodos de preparación secado al vacío y criodesecado (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración de esterilización. En general, se preparan dispersiones incorporando el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT 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, son ejemplos de métodos de preparación secado al vacío y criodesecado (liofilización) que producen un polvo del conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución esterilizada por filtración previamente del mismo.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención o una combinación de conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención.

Como se ha descrito anteriormente, en otro aspecto, la invención se refiere al conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la invención como se define en el presente documento para uso como un medicamento.

Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la invención pueden usarse para varios fines. En particular, los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la invención pueden usarse para el tratamiento de diversas formas de cáncer. En un aspecto los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la invención se usan para el tratamiento de diversos tipos de cáncer sólido tales como: tumores del sistema nervioso central, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no microcíticas), cáncer de mama (tal como cáncer de mama triple negativo), cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de hígado y biliar, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer endometrial, cáncer ovárico, melanoma maligno, sarcoma (tejido blando por ejemplo hueso y músculo), tumores de origen primario desconocido (es decir primarios desconocidos), leucemia, cáncer de médula ósea (tal como mieloma múltiple), leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica y linfoma no de Hodgkin, leucemia mieloide aguda (AML), cáncer de piel, glioma, cáncer del cerebro, útero y recto.

Además la inflamación autoinmunitaria, tal como miopatías o esclerosis múltiple, puede ser diana de los conjugados farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención.

Los trastornos hemostáticos relacionados con cáncer también pueden ser diana de la presente invención.

Enfermedades adicionales con inflamación, tales como miopatías, artritis reumatoide, osteoartritis, espondilitis anquilosante, gota, espondiloartropatía, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, artropatía psoriásica, espondilitis enteropática, artropatía juvenil, artropatía reactiva, artritis infecciosa o postinfecciosa, artritis tuberculosa, artritis vírica, artritis fúngica, artritis sifilítica, glomerulonefritis, enfermedad renal de estadio final, lupus eritematoso sistémico, mb. Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino, fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, asma alérgica, bronquitis, bronquiolitis aguda, bronquiolitis crónica, fibrosis pulmonar idiopática o esclerosis múltiple pueden ser diana de los anticuerpos anti FT de la presente invención.

Además enfermedades vasculares tales como reestenosis vascular, enfermedad vascular miocárdica, enfermedad vascular cerebral, retinopatía y degeneración macular, incluyendo pero sin limitación AMD húmeda pueden tratarse con conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT.

Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención también pueden ser útiles para el tratamiento de pacientes con riesgo cardiovascular, tal como aterosclerosis, hipertensión, diabetes, dislipidemia y síndrome coronario agudo, incluyendo pero sin limitación Infarto de Miocardio Agudo, ictus.

5 Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención también pueden ser útiles para la inhibición de la trombosis, tal como DVT, embolia renal, embolia pulmonar, trombosis arterial o para tratar trombosis que se produce después de cirugía arterial, injertos de derivación vascular periférica o injertos de derivación de arterias coronarias, shunts arteriovenosos, retirada de una implementación, tal como un estent o un catéter.

10 Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención también pueden ser útiles para inhibición de la lesión de reperfusión isquémica renal.

Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención también pueden ser útiles para tratamiento de hiperlipoproteinemia o hiperparatiroidismo.

15 Los conjugados farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención también pueden ser útiles para tratamiento de vasculitis, vasculitis ANCA positiva o enfermedad de Behcet.

20 Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención también pueden ser útiles para bloquear insuficiencia respiratoria inducida por traumatismo, tal como síndrome de dificultad respiratoria aguda o lesión pulmonar aguda.

25 Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención también pueden ser útiles para bloquear disfunción orgánica inducida por infección, tal como insuficiencia renal, síndrome de dificultad respiratoria aguda o enfermedad pulmonar aguda.

30 Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención también pueden ser útiles para tratar diversos trastornos tromboembólicos tales como los que surgen de angioplastia, infarto de miocardio, angina inestable y estenosis de arteria coronaria.

Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención también pueden ser útiles en un entorno profiláctico para tratar complicaciones mediadas por FT a infecciones sistémicas, tales como septicemia o neumonía.

35 Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención también pueden ser útiles como tratamiento profiláctico de pacientes con vasos ateroscleróticos en riesgo de trombosis.

40 Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención también pueden ser útiles para tratamiento de enfermedad de injerto contra hospedador.

Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención también pueden ser útiles para aumentar el injerto de células beta en trasplante de islotes, para evitar la vasculopatía de aloinjerto cardíaco (CAV) y para prevenir el rechazo de injerto agudo.

45 También se desvela en el presente documento un método para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de una célula tumoral que expresa FT, que comprende la administración, a un individuo que lo necesite, de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la invención. Dicha célula tumoral puede estar implicada en cáncer, tal como  
 50 cáncer de próstata, cáncer de pulmón (tal como cáncer de pulmón de células no microcíticas), cáncer de mama (tal como cáncer de mama triple negativo), cáncer colorrectal (tal como cáncer colorrectal metastásico), cáncer pancreático, cáncer endometrial, cáncer ovárico, melanoma cutáneo, cáncer de médula ósea de leucemia (tal como mieloma múltiple), leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica y linfoma no de Hodgkin, cáncer de piel, cáncer de próstata, glioma, cáncer del cerebro, riñones, útero, vejiga, leucemia mieloide aguda (AML) y recto. Además, la invención se refiere al uso de conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT que se unen con FT humano para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, tal como una de las indicaciones de  
 55 cáncer específicas mencionadas anteriormente.

En una realización, la selección de pacientes para tratar con conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT se basa en el nivel de FT en su orina y/o sangre. En una realización particular, el paciente para tratar tiene un nivel relativamente alto de FT en orina y/o sangre. Por ejemplo, el paciente para tratar puede tener un nivel de FT en orina  
 60 de más de 20 ng/ml, tal como más de 40 ng/ml, por ejemplo más de 100 ng/ml, tal como más de 200 ng/ml. Como alternativa, o además, el nivel de FT en suero de los pacientes puede ser de más de 100 pg/ml, tal como de más de 200 pg/ml. Esto puede determinarse, por ejemplo, usando un ELISA. Los métodos para hacer esto incluyen pero sin limitación los descritos posteriormente en relación con usos de diagnóstico.

65 Sin embargo, también se desvela en el presente documento el tratamiento de pacientes con conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención que tiene un nivel menor de FT en orina y/o sangre.

También se desvela en el presente documento que la selección de pacientes para tratar con conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención puede basarse en el nivel de expresión de FT. El nivel de expresión de FT puede evaluarse exponiendo los pacientes a un anticuerpo anti FT radiomarcado y midiendo después el nivel de radiactividad de los pacientes. El anticuerpo anti FT radiomarcado puede ser un anticuerpo anti FT descrito en la presente invención, es decir, un anticuerpo de los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT descritos en el presente documento, o puede ser otro anticuerpo anti FT. Los ejemplos de radiomarcadores pueden ser cualquiera de los descritos anteriormente en relación con radiomarcaje de anticuerpos. Los métodos para hacerlo incluyen pero sin limitación los descritos posteriormente en relación con usos de diagnóstico.

También se desvela en el presente documento que la eficacia de tratamiento puede supervisarse durante la terapia, por ejemplo en puntos temporales predefinidos. La eficacia puede supervisarse midiendo el nivel de FT en orina o sangre, por ejemplo mediante ELISA. Los métodos para hacerlo incluyen pero sin limitación los descritos posteriormente en relación con usos de diagnóstico. En otra realización, la eficacia puede determinarse por visualización del área de enfermedad, por ejemplo realizando una o más exploraciones de PET-CT, por ejemplo usando un anticuerpo anti FT marcado, tal como un anticuerpo anti FT marcado descrito en la presente invención. Además, podrían usarse anticuerpos anti FT marcados, tales como anticuerpos anti FT marcados 011, 098, 114 y 111 desvelados en el presente documento para detectar tumores productores de FT por ejemplo usando una exploración PET-CT.

Los regímenes de dosificación en los métodos anteriores de tratamiento y usos se ajustan para proporcionar la respuesta terapéutica deseada óptima. Por ejemplo, puede administrarse una única dosis, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como indican las exigencias de la situación terapéutica. Las composiciones parenterales pueden formularse en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos para 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 para las formas de dosificación unitarias de la presente invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular para conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de preparación de compuestos de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Las dosificaciones eficaces y los regímenes de dosificación para los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT dependen de la enfermedad o afección para tratar y pueden determinarse por los expertos en la materia. Un intervalo no limitante, ejemplar, para una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención es de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-50 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,1-20 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-10 mg/kg, tal como aproximadamente 0,5-5 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 5 mg/kg, tal como aproximadamente 4 mg/kg o aproximadamente 3 mg/kg, o aproximadamente 2 mg/kg, o aproximadamente 1 mg/kg, o aproximadamente 0,5 mg/kg, o aproximadamente 0,3 mg/kg. Un intervalo no limitante, ejemplar, para una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención es de aproximadamente 0,02-30 mg/kg, tal como aproximadamente 0,1-20 mg/kg, o aproximadamente 0,5-10 mg/kg, o aproximadamente 0,5-5 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 1-2 mg/kg, en particular de los anticuerpos 011, 098, 114 o 111 como se desvela en el presente documento.

Un médico que tiene experiencia habitual en la técnica puede determinar fácilmente y recetar la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico podría iniciar dosis del conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT empleado en la composición farmacéutica a niveles menores de lo requerido para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la presente invención será la cantidad del compuesto que sea la menor dosis eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz en general de los factores descritos anteriormente. La administración puede ser por ejemplo intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea y por ejemplo administrarse próxima al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias. Aunque es posible que un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT como una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente.

En una realización, el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT puede administrarse por infusión en una dosificación semanal de 10 a 1500 mg/m<sup>2</sup>, tal como de 30 a 1500 mg/m<sup>2</sup>, o tal como de 50 a 1000 mg/m<sup>2</sup>, o tal como de 10 a 500 mg/m<sup>2</sup>, o tal como de 100 a 300 mg/m<sup>2</sup>. Dicha administración puede repetirse, por ejemplo, de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración puede realizarse por infusión continua durante un periodo de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas.

En una realización, los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT pueden administrarse por infusión cada tres semanas en una dosificación de 30 a 1500 mg/m<sup>2</sup>, tal como de 50 a 1000 mg/m<sup>2</sup> o de 100 a 300 mg/m<sup>2</sup>. Dicha administración puede repetirse, por ejemplo, de 1 a 8 veces, tal como de 3 a 5 veces. La administración puede realizarse por infusión continua durante un periodo de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas.

5 En una realización, los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT pueden administrarse por infusión continua lenta durante un periodo largo, tal como más de 24 horas, para reducir los efectos secundarios tóxicos.

10 En una realización los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT pueden administrarse en una dosificación semanal de 50 mg a 2000 mg, tal como por ejemplo 50 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg o 2000 mg, hasta 16 veces, tal como de 4 a 10 veces, tal como de 4 a 6 veces. La administración puede realizarse por infusión continua durante un periodo de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. Dicho régimen puede repetirse una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosificación puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención en la sangre tras la administración, por ejemplo tomando una muestra biológica y usando anticuerpos antiidiotípicos que se dirigen a la región de unión a antígeno de los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT de la presente invención.

20 En una realización, el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT puede administrarse por terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un periodo de 6 meses o más.

25 En una realización, los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT pueden administrarse por un régimen que incluye una infusión de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención seguido de una infusión de un anticuerpo anti FT de la presente invención, tal como anticuerpo 011, 098, 114 o 111 desvelado en el presente documento que contiene un radioisótopo. El régimen puede repetirse, por ejemplo, de 7 a 9 días después.

30 Como ejemplos no limitantes, puede proporcionarse el tratamiento de acuerdo con la presente invención como una dosificación semanal, bisemanal, trisemanal o mensual de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tal como 0,3-3 mg/kg, por ejemplo 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, por día, en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40, o, como alternativa, al menos una de las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o en algunos casos la semana 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 después del inicio del tratamiento, o cualquier combinación de los mismos, usando dosis individuales o divididas cada 24, 12, 8, 6, 4 o 2 horas, o cualquier combinación de las mismas.

40 Una "cantidad eficaz" para terapia tumoral también puede medirse por su capacidad para estabilizar la progresión de enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir cáncer puede evaluarse en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o para inducir apoptosis por ensayos *in vitro* conocidos por los expertos en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño tumoral, o aliviar de otro modo síntomas en un sujeto. Un experto habitual en la materia sería capaz de determinar dichas cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición o vía de administración particular seleccionada.

50 Un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT también puede administrarse de forma profiláctica para reducir el riesgo de desarrollar cáncer, retardar el inicio de la aparición de un acontecimiento en la progresión del cáncer y/o reducir el riesgo de reaparición cuando un cáncer está en remisión. Esto puede ser especialmente útil en pacientes donde es difícil localizar un tumor que se sabe que está presente debido a otros factores biológicos.

55 El conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT también puede administrarse en terapia de combinación, es decir, combinado con otros agentes terapéuticos relevantes para la enfermedad o afección para tratar. En consecuencia, en una realización, el medicamento de conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT es para combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como un agente citotóxico, quimioterapéutico o antiangiogénico.

60 Dicha administración combinada puede ser simultánea, separada o secuencial. Para administración simultánea, los agentes pueden administrarse como una composición o como composiciones separadas, según sea apropiado. La presente invención por lo tanto también proporciona métodos para tratar un trastorno que implica células que expresan FT como se ha descrito anteriormente, métodos que comprenden la administración de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención combinado con uno o más agentes terapéuticos adicionales como se ha descrito anteriormente.

65 También se desvela en el presente documento un método para tratar un trastorno que implica células que expresan FT en un sujeto, método que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado

farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención y al menos un agente quimioterapéutico a un sujeto que lo necesite.

5 También se desvela en el presente documento un método para tratar o prevenir cáncer, método que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención y al menos un agente quimioterapéutico a un sujeto que lo necesite.

10 En una realización, la presente invención proporciona el uso de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para administrar con al menos un agente quimioterapéutico para tratar el cáncer.

15 En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse de un antimetabolito, tal como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina, hidroxiaurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina y agentes similares.

20 En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse de un agente alquilante, tal como mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C, cisplatino y otros derivados de platino, tales como carboplatino y agentes similares.

25 En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse de un agente antimetabólico, tal como taxanos, por ejemplo docetaxel y paclitaxel, y alcaloides de vinca, por ejemplo vindesina, vincristina, vinblastina y vinorelbina.

30 En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse de un inhibidor de topoisomerasa, tal como topotecán o irinotecán.

35 En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse de un fármaco citostático, tal como etopósido y tenipósido.

40 En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse de un inhibidor de factor de crecimiento, tal como un inhibidor de ErbB1 (EGFR) (tal como Iressa, erbitux (cetuximab), tarceva y agentes similares), un inhibidor de ErbB2 (Her2/neu) (tal como herceptina y agentes similares) y agentes similares.

45 En una realización, dicho agente quimioterapéutico puede seleccionarse de un inhibidor de tirosina quinasa, tal como imatinib (Glivec, Gleevec ST11571), lapatinib, PTK787/ZK222584 y agentes similares.

50 También se desvela en el presente documento un método para tratar un trastorno que implica células que expresan FT en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención y al menos un inhibidor de la angiogénesis, neovascularización y/u otra vascularización a un sujeto que lo necesite.

55 Son ejemplos de dichos inhibidores de angiogénesis inhibidores de uroquinasa, inhibidores de la metaloproteasa de matriz (tales como marimastat, neovastat, BAY 12-9566, AG 3340, BMS-275291 y agentes similares), inhibidores de migración y proliferación de células endoteliales (tal como TNP-470, escualamina, 2-metoxiestradiol, combretastatinas, endostatina, angiostatina, penicilamina, SCH66336 (Schering-Plough Corp, Madison, NJ), R115777 (Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ) y agentes similares), antagonistas de factores de crecimiento angiogénicos (tales como ZD6474, SU6668, anticuerpos contra agentes angiogénicos y/o sus receptores (tales como VEGF, bFGF y angiopoyetina-1), talidomida, análogos de talidomida (tales como CC-5013), Sugen 5416, SU5402, ribozima antiangiogénica (tal como angiozima), interferón  $\alpha$  (tal como interferón  $\alpha$ 2a), suramina y agentes similares), inhibidores de la quinasa VEGF-R y otros inhibidores de tirosina quinasa antiangiogénicos (tales como SU011248), inhibidores de señalización de supervivencia/integrina específica endotelial (tal como vitaxina y agentes similares), antagonistas/quelantes de cobre (tales como tetratiomolibdato, captopril y agentes similares), carboxiamido triazol (CAI), ABT-627, CM101, interleucina-12 (IL-12), IM862, PNU145156E así como moléculas de nucleótidos que inhiben la angiogénesis (tales como ADNc de VEGF antisentido, ADNc que codifica angiostatina, ADNc que codifica p53 y ADNc que codifica receptor de VEGF-2 deficiente) y agentes similares.

60 Otros ejemplos de dichos inhibidores de angiogénesis, neovascularización y/u otra vascularización son derivados de heparina antiangiogénicos y moléculas relacionadas (por ejemplo, heparinasa III), temozolomida, NK4, factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), inhibidores de ciclooxigenasa-2, inhibidores de factor inducible por hipoxia 1, isoflavonas de soja antiangiogénicas, oltipraz, fumagilina y análogos de los mismos, análogos de somatostatina, polisulfato de pentosán, tecogalán sódico, dalteparina, tumstatina, trombospondina, NM-3, combrestatina, canstatina, avastatina, anticuerpos contra otras dianas relevantes (tales como mAb anti-integrina alfa-v/beta-3 y anti-quinostatina) y agentes similares.

65

En una realización, un agente terapéutico para uso en combinación con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención para tratar los trastornos como se ha descrito anteriormente puede ser un inmunógeno antineoplásico, tal como un antígeno de cáncer/antígeno asociado a tumor (por ejemplo, molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM/TACSTD1), mucina 1 (MUC1), antígeno carcinoembrionario (CEA), glucoproteína asociada a tumores 72 (TAG-72), gp100, Melan-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, vacunas víricas asociadas a cáncer (por ejemplo, vacunas de papilomavirus humano), proteínas de choque térmico derivadas de tumor y agentes similares. Varios otros antígenos de cáncer adecuados/antígenos asociados a tumor descritos en otra parte del presente documento y moléculas similares conocidas en la técnica pueden también o como alternativa usarse en dicha realización. Los péptidos inmunogénicos antineoplásicos también incluyen "vacunas" antiidiotípicas tales como anticuerpos antiidiotípicos BEC2, Mitumomab, CeaVac y anticuerpos antiidiotípicos relacionados, anticuerpo antiidiotípico para el anticuerpo MG7 y otros anticuerpos antiidiotípicos antineoplásicos (véase por ejemplo Birebent *et al.*, *Vaccine*. 21 (15), 1601-12 (2003), Li *et al.*, *Chin Med J (Engl)*. 114 (9), 962-6 (2001), Schmitt *et al.*, *Hybridoma*. 13 (5), 389-96 (1994), Maloney *et al.*, *Hybridoma*. 4 (3), 191-209 (1985), Raychardhuri *et al.*, *J Immunol*. 137 (5), 1743-9 (1986), Pohl *et al.*, *Int J Cancer*. 50 (6), 958-67 (1992), Bohlen *et al.*, *Cytokines Mol Ther*. 2 (4), 231-8 (1996) y Maruyama, *J Immunol Methods*. 264 (1-2), 121-33 (2002)). Dichos Ab antiidiotípicos pueden opcionalmente conjugarse con un vehículo, que puede ser un vehículo de molécula sintética (típicamente inerte), una proteína (por ejemplo hemocianina de lapa californiana (KLH) (véase por ejemplo Ochi *et al.*, *Eur J Immunol* 17 (11), 1645-8 (1987)), o una célula (por ejemplo, un glóbulo rojo, véase por ejemplo, Wi *et al.*, *J. Immunol Methods*. 122 (2), 227-34 (1989)).

En una realización de la invención, el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT se combina con un fármaco de inmunooncología tal como Yervoy (ipilimumab) que actúa potencialmente induciendo inmunidad de linfocitos T contra el cáncer. La citorreducción con el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT en combinación con un fármaco inmunoestimulante podría proporcionar beneficio clínico significativo a los pacientes.

En una realización, un agente terapéutico para uso en combinación con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención para tratar los trastornos como se ha descrito anteriormente puede ser una citocina antineoplásica, quimiocina o combinación de las mismas. Los ejemplos de citocinas y factores de crecimiento adecuados incluyen IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN $\alpha$  (por ejemplo, INF $\alpha$ 2b), IFN $\beta$ , GM-CSF, CD40L, ligando Flt3, factor de células madre, anacemim y TNF $\alpha$ . Las quimiocinas adecuadas pueden incluir quimiocinas negativas para Glu-Leu-Arg (ELR) tales como IP-10, MCP-3, MIG y SDF-1 $\alpha$  de las familias de quimiocinas CXC y C-C humanas. Las citocinas adecuadas incluyen derivados de citocinas, variantes de citocinas, fragmentos de citocinas y proteínas de fusión de citocinas. Estos y otros métodos o usos que implican ácidos nucleicos que codifican péptidos de origen natural en el presente documento pueden como alternativa o adicionalmente realizarse por "activación génica" y técnicas de regulación positiva de genes de recombinación homóloga, tal como se describen en los documentos US 5.968.502, US 6.063.630 y US 6.187.305 y EP 0505500.

En una realización, un agente terapéutico para uso en combinación con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención para tratar los trastornos como se ha descrito anteriormente puede ser un regulador de la apoptosis/control del ciclo celular (o "agente regulador"). Un regulador de la apoptosis/control del ciclo celular puede incluir moléculas que se dirijan a y modulen los reguladores de la apoptosis/control del ciclo celular tales como (i) cdc-25 (tal como NSC 663284), (ii) quinasas dependientes de ciclina que sobreestimulan el ciclo celular (tales como flavopiridol (L868275, HMR1275), 7-hidroxiestaurosporina (UCN-01, KW-2401) y roscovitina (R-roscovitina, CYC202)) y (iii) moduladores de telomerasa (tales como BIBR1532, SOT-095, GRN163 y composiciones descritas por ejemplo en los documentos US 6.440.735 y US 6.713.055). Los ejemplos no limitantes de moléculas que interfieren con rutas apoptóticas incluyen ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL)/ligando de apoptosis-2 (Apo-2L), anticuerpos que activan receptores de TRAIL, IFN y Bcl-2 antisentido.

En una realización, un agente terapéutico para uso en combinación con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención para tratar los trastornos como se ha descrito anteriormente puede ser un agente regulador hormonal, tal como agentes útiles para terapia antiandrógenos y antiestrógenos. Son ejemplos de dichos agentes reguladores hormonales tamoxifeno, idoxifeno, fulvestrant, droloxifeno, toremifeno, raloxifeno, dietilestilbestrol, etinilestradiol/etinilo, un antiandrógeno (tal como flutamida/eulexina), una progestina (tal como caproato de hidroxiprogesterona, medroxiprogesterona/provera, acetato de megestrol/megace), un adrenocorticosteroide (tal como hidrocortisona, prednisona), hormona liberadora de hormona luteinizante (y análogos de la misma y otros agonistas de LHRH tales como buserelina y goserelina), un inhibidor de aromatasa (tal como anastrozol/arimidex, aminoglutetimida/citraden, exemestano), un inhibidor hormonal (tal como octreótido/sandostatina) y agentes similares.

En una realización, un agente terapéutico para uso en combinación con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención para tratar los trastornos como se ha descrito anteriormente puede ser un agente antianérgico (por ejemplo compuestos de moléculas pequeñas, proteínas, glucoproteínas o anticuerpos que rompen la tolerancia a antígenos tumorales y cancerosos). Son ejemplos de dichos compuestos moléculas que bloquean la actividad de CTLA-4, tales como MDX-010/Yervoy (ipilimumab) (Phan *et al.*, *PNAS USA* 100, 8372 (2003)), que potencialmente actúan induciendo inmunidad de linfocitos T contra el cáncer. La citorreducción con el

conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT en combinación con un fármaco inmunoestimulante podría proporcionar beneficio clínico significativo a los pacientes.

En una realización, un agente terapéutico para uso en combinación con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención para tratar los trastornos como se ha descrito anteriormente puede ser un ácido nucleico o vector que contenga genes supresores de tumores tal como un adenovirus deficiente en replicación que codifica p53 de tipo silvestre recombinante humano/SCH58500, etc.; ácidos nucleicos antisentido dirigidos a oncogenes, genes mutados o genes desregulados; o ARNip dirigido a genes mutados o desregulados. Los ejemplos de dianas supresoras de tumores incluyen, por ejemplo, BRCA1, RB1, BRCA2, DPC4 (Smad4), MSH2, MLH1 y DCC.

En una realización, un agente terapéutico para uso en combinación con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención para tratar los trastornos como se ha descrito anteriormente puede ser un ácido nucleico antineoplásico, tal como genasense (augmerosen/G3139), LY900003 (ISIS 3521), ISIS 2503, OGX-011 (ISIS 112989), LE-AON/LEraf-AON (oligonucleótido antisentido c-raf encapsulado en liposoma/ISIS-5132), MG98 y otros ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a PKC $\alpha$ , clusterina, IGFBP, proteína quinasa A, ciclina D1 o Bcl-2h.

En una realización, un agente terapéutico para uso en combinación con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención para tratar los trastornos como se ha descrito anteriormente puede ser una molécula de ARN inhibidora antineoplásica (véase por ejemplo, Lin *et al.*, *Curr Cancer Drug Targets*. 1 (3), 241-7 (2001), Erratum en: *Curr Cancer Drug Targets*. 3 (3), 237 (2003), Lima *et al.*, *Cancer Gene Ther*. 11 (5), 309-16 (2004), Grzmil *et al.*, *Int J Oncol*. 4 (1), 97-105 (2004), Collis *et al.*, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 57 (2 Supl), S144 (2003), Yang *et al.*, *Oncogene*. 22 (36), 5694-701 (2003) y Zhang *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*. 303 (4), 1169-78 (2003)).

Las composiciones y los métodos de administración de combinación de la presente invención también incluyen la administración de vacunas de ácido nucleico, tales como vacunas de ADN desnudo que codifican dichos antígenos de cáncer/antígenos asociados a tumor (véase por ejemplo documentos US 5.589.466, US 5.593.972, US 5.703.057, US 5.879.687, US 6.235.523 y US 6.387.888). En una realización, el método de administración de combinación y/o la composición de combinación comprende una composición de vacuna autóloga. En una realización, la composición de combinación y/o el método de administración de combinación comprende una vacuna de células completas o célula que expresa citocinas (por ejemplo un fibroblasto que expresa IL-2 recombinante, célula dendrítica que expresa citocinas recombinantes y similares) (véase ejemplo Kowalczyk *et al.*, *Acta Biochim Pol*. 50 (3), 613-24 (2003), Reilly *et al.*, *Methods Mol Med*. 69, 233-57 (2002) y Tirapu *et al.*, *Curr Gene Ther*. (1), 79-89 (2002)). Otro ejemplo de dicho enfoque de células autólogas que puede ser útil en métodos de combinación de la presente invención es el método de inmunoterapia personalizada de MyVax® (previamente denominado GTOP-99) (Genitope Corporation - Redwood City, CA, Estados Unidos).

En una realización, la presente invención proporciona composiciones de combinación y métodos de administración de combinación donde un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención se combina o se coadministra con un virus, proteínas víricas y similares. Los virus deficientes en replicación, que generalmente tienen capacidad de uno o solamente algunos ciclos de replicación *in vivo*, y que se dirigen a células tumorales, pueden ser, por ejemplo, componentes útiles de dichas composiciones y métodos. Dichos agentes víricos pueden comprender o estar asociados con ácidos nucleicos que codifican inmunoestimulantes, tales como GM-CSF y/o IL-2. Los virus tanto oncolíticos de forma natural como dichos oncolíticos recombinantes (por ejemplo virus VHS-1, reovirus, adenovirus deficientes en replicación y sensibles a replicación, etc.) pueden ser componentes útiles de dichos métodos y composiciones. En consecuencia, en una realización, la presente invención proporciona composiciones de combinación y métodos de administración de combinación donde un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT se combina o se coadministra con un virus oncolítico. Los ejemplos de dichos virus incluyen adenovirus oncolíticos y virus del herpes, que pueden ser o no virus modificados (véase por ejemplo Shah *et al.*, *J Neurooncol*. 65(3), 203-26 (2003), Stiles *et al.*, *Surgery*. 134(2), 357-64 (2003), Sunamura *et al.*, *Pancreas*. 28(3), 326-9 (2004), Teshigahara *et al.*, *J Surg Oncol*. 85(1), 42-7 (2004), Varghese *et al.*, *Cancer Gene Ther*. 9(12), 967-78 (2002), Wildner *et al.*, *Cancer Res*. 59(2), 410-3 (1999), Yamanaka, *Int J Oncol*. 24(4), 919-23 (2004) y Zwiebel *et al.*, *Semin Oncol*. 28(4), 336-43 (2001).

Las composiciones de combinación y métodos de administración de combinación de la presente invención también pueden implicar métodos de inmunoterapia de "células completas" y "adoptivos". Por ejemplo, dichos métodos pueden comprender infusión o reinfusión de células del sistema inmunitario (por ejemplo linfocitos que se infiltran en tumores (TIL), tales como linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o CD8<sup>+</sup> (por ejemplo linfocitos T expandidos con antígenos específicos de tumor y/o potenciaciones genéticas), linfocitos B que expresan anticuerpos u otras células presentadoras/productoras de anticuerpos, células dendríticas (CD) (por ejemplo, células dendríticas recombinantes que expresan anticitocinas, células dendríticas cultivadas con un agente expansor de CD tales como GM-CSF y/o Flt3-L y/o células dendríticas cargadas con antígenos asociados a tumor), linfocitos NK antitumorales, denominados células híbridas, o combinaciones de los mismos. Los lisados celulares también pueden ser útiles en dichos métodos y composiciones. Las "vacunas" celulares en ensayos clínicos que pueden ser útiles en dichos aspectos incluyen lisados celulares Canvaxin™, APC-8015 (Dendreon), HSPPC-96 (Antigenics) y Melacine®. Los antígenos

desprendidos de células de cáncer y mezclas de los mismos (véase por ejemplo Bystryn *et al.*, Clinical Cancer Research Vol. 7, 1882-1887, julio de 2001), opcionalmente mezclados con adyuvantes tales como alumbre, también pueden ser componentes en dichos métodos y composiciones de combinación.

5 También se desvela en el presente documento que un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención puede suministrarse a un paciente en combinación con la aplicación de un método de vacunación interna. La vacunación interna se refiere a muerte de células tumorales o cancerosas inducida, tal como muerte celular inducida por fármaco o inducida por radiación de células tumorales, en un paciente, que típicamente conduce a la inducción de una respuesta inmunitaria dirigida hacia (i) las células tumorales en su conjunto o (ii) partes de las células tumorales que incluyen (a) proteínas secretadas, glucoproteínas u otros productos, (b) proteínas asociadas a membrana o glucoproteínas u otros componentes asociados con o insertados en membranas, y/o (c) proteínas intracelulares u otros componentes intracelulares. Una respuesta inmunitaria inducida por vacunación interna puede ser humoral (es decir mediada por complemento-anticuerpo) o mediada por células (por ejemplo, el desarrollo y/o aumento de linfocitos T citotóxicos endógenos que reconocen las células tumorales destruidas internamente o partes de las mismas). Además de radioterapia, son ejemplos no limitantes de fármacos y agentes que pueden usarse para inducir dicha muerte de células tumorales y vacunación interna agentes quimioterapéuticos convencionales, inhibidores del ciclo celular, fármacos antiangiogénesis, anticuerpos monoclonales, agentes inductores de la apoptosis e inhibidores de transducción de señal.

20 Son ejemplos de otros agentes antineoplásicos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para uso en combinación con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención para tratar los trastornos como se ha descrito anteriormente agentes inductores de diferenciación, análogos de ácido retinoico (tales como ácido transretinoico, ácido 13-cis retinoico y agentes similares), análogos de vitamina D (tales como seocalcitol y agentes similares), inhibidores de ErbB3, ErbB4, IGF-IR, receptor de insulina, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , Flk2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TRKA, TRKC, c-met, Ron, Sea, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Alk, LTK, PTK7 y agentes similares.

30 Son ejemplos de otros agentes antineoplásicos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para uso en combinación con el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención para tratar los trastornos como se ha descrito anteriormente cathepsina B, moduladores de actividad cathepsina D deshidrogenasa, glutatión-S-transferasa (tal como glutacilcisteína sintetasa y lactato deshidrogenasa) y agentes similares.

35 Son ejemplos de otros agentes antineoplásicos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para uso en combinación con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención para tratar los trastornos como se ha descrito anteriormente estramustina y epirubicina.

40 Son ejemplos de otros agentes antineoplásicos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para uso en combinación con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención para tratar los trastornos como se ha descrito anteriormente un inhibidor de HSP90 como 17-*alil* amino geldanamicina, anticuerpos dirigidos contra un antígeno tumoral tal como PSA, CA125, KSA, etc., integrinas como integrina  $\beta$ 1, inhibidores de VCAM y agentes similares.

45 Son ejemplos de otros agentes antineoplásicos, que pueden ser relevantes como agentes terapéuticos para uso en combinación con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención para tratar los trastornos como se ha descrito anteriormente inhibidores de calcineurina (tales como valspodar, PSC 833 y otros inhibidores de MDR-1 o p-glicoproteína), inhibidores de TOR (tales como sirolimus, everolimus y rapamicina) e inhibidores de mecanismos de "dirección linfocítica" (tales como FTY720) y agentes con efectos en la señalización celular tales como inhibidores de moléculas de adhesión (por ejemplo anti LFA, etc.).

50 En una realización, el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la invención es para uso en combinación con uno o más anticuerpos terapéuticos, tales como bevacizumab (Avastin®), zalutumumab, cetuximab (Erbix®), panitumumab (Vectibix™), ofatumumab (Arzerra®), zanolimumab, daratumumab (HuMax-CD38), ranibizumab (Lucentis®), daclizumab (Zenapax®), basiliximab (Simulect®), infliximab (Remicade®), adalimumab (Humira®), natalizumab (Tysabri®), omalizumab (Xolair®), efalizumab (Raptiva®), nimotuzumab, rituximab (Rituxan®/MabThera®) y/o trastuzumab (Herceptin®). Otros anticuerpos terapéuticos que pueden usarse en combinación con el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención son los desvelados en el documento WO98/40408 (anticuerpos que pueden unirse con FT humano nativo), WO04/094475 (anticuerpos capaces de unirse con factor tisular humano, que no inhiben la coagulación sanguínea mediada por el factor en comparación con un control de plasma normal), WO03/093422 (anticuerpos que se unen con mayor afinidad con el complejo FT:VIIa que con FT solamente), WO03/037361 (agonista o antagonista de FT para el tratamiento relacionado con apoptosis) o WO 2010/066803 (anticuerpos monoclonales humanos contra el factor tisular).

65 En una realización, el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT puede administrarse en relación con el suministro de uno o más agentes que promueven acceso del conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT o composición de combinación al interior de un tumor. Dichos métodos pueden realizarse, por ejemplo, en asociación

con el suministro de una relaxina, que es capaz de relajar un tumor (véase por ejemplo documento US 6.719.977). En una realización, un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención puede unirse con un péptido que penetra en células (CPP). Los péptidos que penetran en células y péptidos relacionados (tales como anticuerpos que penetran en células modificadas técnicamente) se describen por ejemplo en Zhao *et al.*, J Immunol Methods. 254(1-2), 137-45 (2001), Hong *et al.*, Cancer Res. 60(23), 6551-6 (2000). Lindgren *et al.*, Biochem J. 377(Pt 1), 69-76 (2004), Buerger *et al.*, J Cancer Res Clin Oncol. 129(12), 669-75 (2003), Pooga *et al.*, FASEB J. 12(1), 67-77 (1998) y Tseng *et al.*, Mol Pharmacol. 62(4), 864-72 (2002).

También se desvela en el presente documento un método para tratar un trastorno que implica células que expresan FT en un sujeto, método que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención y al menos un agente antiinflamatorio a un sujeto que lo necesite.

Dicho agente antiinflamatorio puede seleccionarse de aspirina y otros salicilatos, inhibidores de Cox-2 (tales como rofecoxib y celecoxib), AINE (tales como ibuprofeno, fenoprofeno, naproxeno, sulindac, diclofenac, piroxicam, ketoprofeno, diflunisal, nabumetona, etodolac, oxaprozina e indometacina), anticuerpos anti IL6R, anticuerpos anti IL8 (por ejemplo anticuerpos descritos en el documento WO2004058797, por ejemplo 10F8), anticuerpos anti IL15 (por ejemplo anticuerpos descritos en los documentos WO03017935 y WO2004076620), anticuerpos anti IL15R, anticuerpos anti CD4 (por ejemplo zanolimumab), anticuerpos anti CD11a (por ejemplo, efalizumab), anticuerpos antiintegrina alfa-4/beta-1 (VLA4) (por ejemplo natalizumab), CTLA4-Ig para tratamiento de enfermedades inflamatorias, prednisolona, prednisona, fármacos antiinflamatorios modificadores de enfermedad (FARME) tales como metotrexato, hidroxilcloroquina, sulfasalazina, inhibidores de la síntesis de pirimidina (tales como leflunomida), agentes de bloqueo del receptor de IL-1 (tales como anakinra), agentes de bloqueo de TNF- $\alpha$  (tales como etanercept, infliximab y adalimumab) y agentes similares.

También se desvela en el presente documento un método para tratar un trastorno que implica células que expresan FT en un sujeto, comprendiendo dicho método administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención y al menos un agente inmunosupresor y/o inmunomodulador a un sujeto que lo necesite.

Dicho agente inmunosupresor y/o inmunomodulador puede seleccionarse de ciclosporina, azatioprina, ácido micofenólico, mofetil micofenolato, corticosteroides tales como prednisona, metotrexato, sales de oro, sulfasalazina, antimalariales, brequinar, leflunomida, mizoribina, 15-desoxispergualina, 6-mercaptopurina, ciclofosfamida, rapamicina, tacrolimus (FK-506), OKT3, globulina antitimocitos, timopentina, timosina  $\alpha$  y agentes similares.

Dicho agente inmunosupresor y/o inmunomodulador puede seleccionarse de anticuerpos inmunosupresores, tales como anticuerpos que se unen con p75 del receptor de IL-2, anticuerpos contra CD25 (por ejemplo los descritos en el documento WO2004045512, tales como AB1, AB7, AB11 y AB12), o anticuerpos que se unen por ejemplo con MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN $\gamma$ R, TNF $\alpha$ R o TNFR (consisten en dos subunidades: CD120a y CD120b), IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R, IL-8R, IL-10R, CD11a o CD58, o anticuerpos que se unen con sus ligandos.

Dicho agente inmunosupresor y/o inmunomodulador puede seleccionarse de moléculas IL-15R, IL-10R, B7 solubles (B7-1, B7-2, variantes de los mismos y fragmentos de los mismos), ICOS y OX40, un inhibidor de un regulador de linfocitos T negativo (tal como un anticuerpo contra CTLA4) y agentes similares.

También se desvela en el presente documento un método para tratar un trastorno que implica células que expresan FT en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención y un anticuerpo anti C3b (i) a un sujeto que lo necesite.

En una realización, un agente terapéutico para uso en combinación con los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT para tratar los trastornos como se ha descrito anteriormente puede seleccionarse de inhibidores de histona desacetilasa (por ejemplo fenilbutirato) y/o agentes de reparación de ADN (por ejemplo enzimas de reparación de ADN y composiciones relacionadas tales como dimericina).

En una realización, el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT para uso en terapia de combinación con uno cualquiera de los agentes anteriormente mencionados es HuMab-TF-011-vcMMAE.

También se desvela en el presente documento que un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT para uso en terapia de combinación con uno cualquiera de los agentes anteriormente mencionados es HuMab-TF-098-vcMMAE.

También se desvela en el presente documento que un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT para uso en terapia de combinación con uno cualquiera de los agentes anteriormente mencionados es HuMab-TF-111-vcMMAE.

También se desvela en el presente documento que un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT para uso en terapia de combinación con uno cualquiera de los agentes anteriormente mencionados es HuMab-TF-114-vcMMAE. En una realización, el conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT para uso en terapia de combinación con uno cualquiera de los agentes anteriormente mencionados es HuMab-TF-011-mcMMAF.

5 También se desvela en el presente documento que un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT para uso en terapia de combinación con uno cualquiera de los agentes anteriormente mencionados es HuMab-TF-098-mcMMAF.

10 También se desvela en el presente documento que un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT para uso en terapia de combinación con uno cualquiera de los agentes anteriormente mencionados es HuMab-TF-111-mcMMAF.

También se desvela en el presente documento que un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT para uso en terapia de combinación con uno cualquiera de los agentes anteriormente mencionados es HuMab-TF-114-mcMMAF.

15 Los métodos para tratar un trastorno como se ha descrito anteriormente que comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención también pueden comprender terapia fotodinámica dirigida contra el cáncer (por ejemplo terapia láser antineoplásica, que puede practicarse opcionalmente con el uso de agente fotosensibilizador, véase, por ejemplo, Zhang *et al.*, J Control Release. 93(2), 141-50 (2003)), terapias de onda sonora y onda de choque antineoplásicas (véase, por ejemplo, Kambe *et al.*, Hum Cell. 10(1), 87-94 (1997)) y/o terapia nutracéutica antineoplásica (véase por ejemplo, Roudebush *et al.*, Vet Clin North Am Small Anim Pract. 34(1), 249-69, viii (2004) y Rafi, Nutrition. 20(1), 78-82 (2004)). De forma similar, puede usarse un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT para preparación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno como se ha descrito anteriormente para administrar con terapia fotodinámica dirigida contra el cáncer (por ejemplo terapia de láser antineoplásica, que puede practicarse opcionalmente con el uso de agente fotosensibilizador, terapias de onda sonora y onda de choque antineoplásicas y/o terapia nutracéutica antineoplásica.

20 También se desvela en el presente documento un método para tratar un trastorno que implica células que expresan FT en un sujeto, método que comprende administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT, tal como un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención, y radioterapia a un sujeto que lo necesite.

30 También se desvela en el presente documento un método para tratar o prevenir el cáncer, método que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención y radioterapia a un sujeto que lo necesite.

35 En una realización, la presente invención proporciona el uso de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT, de la presente invención, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar cáncer para administrar en combinación con radioterapia.

40 La radioterapia puede comprender radiación o administración de productos radiofarmacéuticos a un paciente. La fuente de radiación puede ser externa o interna al paciente que se trate (el tratamiento por radiación puede ser, por ejemplo, en forma de terapia de radiación de haz externo (EBRT) o braquiterapia (BT)). Los elementos radiactivos que pueden usarse en la práctica de dichos métodos incluyen, por ejemplo, radio, cesio 137, iridio 192, americio 241, oro 198, cobalto 57, cobre 67, tecnecio 99, yodo 123, yodo 131 e indio 111.

45 También se desvela en el presente documento un método para tratar o prevenir el cáncer, método que comprende la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención, en combinación con cirugía.

50 Como se ha descrito anteriormente, una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse en terapia de combinación, es decir, combinada con uno o más agentes relevantes para la enfermedad o afección para tratar como composiciones farmacéuticas separadas o con un compuesto de la presente invención coformulado con uno o más agentes terapéuticos adicionales como se ha descrito anteriormente. Dichas terapias de combinación pueden requerir dosificaciones menores del compuesto de la presente invención y/o los agentes coadministrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

Además de lo anterior, otras terapias de combinación relevantes incluyen lo siguiente:

60 • Para el tratamiento de cáncer pancreático un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención en combinación con un antimetabolito, tal como 5-fluorouracilo y/o gemcitabina, posiblemente en combinación con uno o más compuestos seleccionados de: 90Y-hPAM4, ARC -100, ARQ-197, AZD-6244, bardoxolona metilo, cixutumumab, (IMC-A12), folitixorina de calcio, GVAX, ipilimumab, KRX-0601, merbarona, MGCD-0103, MORAb-009, PX-12, Rh-Apo2L, TLN-4601, trabedersen, volociximab (M200), WX-671, pemetrexed, rubitecan, ixabepilona, OCX-0191Vion, 216586-46-8, lapatinib, matuzumab, imatinib, sorafinib, trastuzumab, exabepilona, erlotinib, Avastin y cetuximab.

- 5 • Para el tratamiento de cáncer colorrectal un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención en combinación con uno o más compuestos seleccionados de: gemcitabina, bevacizumab, FOLFOX, FOLFIRI, XELOX, IFL, oxaliplatino, irinotecán, 5-FU/LV, Capecitabina, UFT, agentes de dirección a EGFR, tales como cetuximab, panitumumab, nimotuzumab, zalutumumab; inhibidores de VEGF o inhibidores de tirosina quinasa tales como sunitinib.
- 10 • Para el tratamiento de cáncer de mama un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención en combinación con uno o más compuestos seleccionados de: antimetabolitos, antraciclinas, taxanos, agentes alquilantes, epotilonas antihormonales (femar, tamoxifeno, etc.), inhibidores de ErbB2 (Her2/neu) (tales como herceptina y agentes similares), CAF/FAC (ciclofosfamida, doxorubicina, 5FU) AC (ciclo, doxo), CMF (ciclo, metotrexato, 5FU), Docetaxel + capecitabina, GT (paclitaxel, gemcitabina), FEC (ciclo, epi, 5FU) en combinación con herceptina: paclitaxel +/-carboplatino, Vinorelbina, Docetaxel, CT en combinación con lapatinib; Capecitabina.
- 15 • Para tratamiento de cáncer de vejiga un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención en combinación con uno o más compuestos seleccionados de: antimetabolitos (gemcitabina, alimta, metotrexato), análogos de platino (cisplatino, carboplatino), inhibidores de EGFR (tales como cetuximab o zalutumumab), inhibidores de VEGF (tales como Avastin) doxorubicina, inhibidores de tirosina quinasa tales como gefitinib, trastuzumab, agente antimetabólico, tal como taxanos, por ejemplo paclitaxel, y alcaloides de la vinca, por ejemplo vinblastina.
- 20 • Para tratamiento de cáncer de próstata, un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención en combinación con uno o más compuestos seleccionados de: terapias hormonales/antihormonales; tales como antiandrógenos, agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) y productos quimioterapéuticos tales como taxanos, mitoxantrona, estramustina, 5FU, vinblastina, ixabepilona.
- 25 • Para tratamiento de cáncer ovárico un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de acuerdo con la presente invención en combinación con uno o más compuestos seleccionados de: un agente antimetabólico, tales como taxanos y alcaloides de la vinca, caelyx, topotecán.

#### Usos de diagnóstico

30 Los anticuerpos anti FT de la invención también pueden usarse para fines de diagnóstico. Los anticuerpos anti FT descritos en el presente documento pueden conjugarse en una realización con un agente de detección o marcador en lugar de un fármaco, haciéndolos de este modo adecuados para fines de diagnóstico. En una realización el uso de diagnóstico de un anticuerpo anti FT o anticuerpo anti FT conjugado con un agente de detección puede usarse en combinación con uno de los otros métodos de la presente invención, en particular un uso farmacéutico del conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención. El anticuerpo anti FT conjugado con un agente de detección puede en ocasiones permitir una detección directa de la unión del anticuerpo anti FT con FT, se proporcionan ejemplos de “agente de detección” o “marcador” a continuación y la referencia a “anticuerpo anti FT” a continuación puede incluir también, cuando sea relevante, referencia a “anticuerpo anti FT conjugado con un agente de detección o marcador”. La expresión “usos de diagnóstico” incluye también medir el nivel de FT en, por ejemplo, plasma, orina o niveles de expresión de FT en biopsias en relación con selección de pacientes para el tratamiento o medición de la eficacia de un tratamiento como se ha descrito anteriormente, y el uso de por ejemplo anticuerpos anti FT radiomarcados, por ejemplo, para seleccionar pacientes para el tratamiento como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una composición de diagnóstico que comprende un anticuerpo anti FT como se ha definido en el presente documento, donde la composición de diagnóstico puede usarse en una realización particular en combinación con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención.

50 En una realización, los anticuerpos anti FT de la presente invención pueden usarse *in vivo* o *in vitro* para diagnosticar enfermedades donde las células que expresan FT desempeñan un papel activo en la patogénesis, detectando niveles de FT, o niveles de células que contienen FT en su superficie de membrana. Esto puede conseguirse, por ejemplo, poniendo en contacto una muestra para ensayar, opcionalmente junto con una muestra de control, con el anticuerpo anti FT en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo anti FT y FT. Después se detecta la formación de complejo (por ejemplo, usando un ELISA). Cuando se usa una muestra de control junto con la muestra de ensayo, el complejo se detecta en ambas muestras y cualquier diferencia estadísticamente significativa en la formación de complejos entre las muestras es indicativa de la presencia de FT en la muestra de ensayo.

60 Por lo tanto, en un aspecto adicional, los anticuerpos anti FT de la presente invención también pueden usarse en un método para detectar la presencia de antígeno FT, o una célula que expresa FT, en una muestra que comprende:

- poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti FT de la invención o una molécula biespecífica de la invención, en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y FT; y
- analizar si se ha formado un complejo.

65 En una realización, el método se realiza *in vitro*.

Más específicamente, los anticuerpos anti FT de la presente invención también pueden usarse en métodos para la identificación y el diagnóstico de células y tejidos invasivos, y otras células diana de anticuerpos anti FT de la presente invención, y para la supervisión del progreso de tratamientos terapéuticos, estado después del tratamiento, riesgo de desarrollar cáncer, progresión del cáncer y similares.

5 En un ejemplo de dicho ensayo de diagnóstico, los anticuerpos anti FT de la presente invención pueden usarse en un método de diagnóstico del nivel de células invasivas en un tejido. Dicho método comprende formar un inmunocomplejo entre un anticuerpo anti FT y tejidos que contienen FT potenciales, y detectar la formación del inmunocomplejo, donde la formulación del inmunocomplejo se correlaciona con la presencia de células invasivas en el tejido. El contacto puede realizarse *in vivo*, usando anticuerpos aislados marcados y técnicas de captura de imágenes convencionales, o puede realizarse *in vitro* en muestras tisulares.

15 Los anticuerpos anti FT de la presente invención pueden también usarse para detectar péptidos que contienen FT y fragmentos peptídicos en cualquier muestra biológica adecuada por cualquier técnica adecuada. Los ejemplos de inmunoensayos convencionales proporcionados por la presente invención incluyen, sin limitación, un ELISA, un RIA, ensayos FACS, ensayos de resonancia de plasmón, ensayos cromatográficos, inmunohistoquímica tisular, transferencia de Western y/o inmunoprecipitación usando un anticuerpo anti FT. Pueden usarse anticuerpos anti FT de la presente invención para detectar FT y fragmentos de FT de seres humanos. Los marcadores adecuados para el anticuerpo anti FT y/o anticuerpos secundarios usados en dichas técnicas incluyen, sin limitación, diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa y acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  y  $^3\text{H}$ .

30 También pueden usarse anticuerpos anti FT para ensayo en una muestra biológica mediante un inmunoensayo de competición que utiliza patrones de péptidos FT marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti FT no marcado. En dicho ensayo, la muestra biológica, el patrón o los patrones de péptidos FT marcados y los anticuerpos anti FT se combinan y se determina la cantidad de patrón de FT marcado unido al anticuerpo anti FT no marcado. La cantidad de péptido FT en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de FT marcado unido al anticuerpo anti FT.

35 Los anticuerpos anti FT son particularmente útiles en la captura de imágenes *in vivo* de tumores. La captura de imágenes *in vivo* de tumores asociados con FT puede realizarse por cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, puede usarse marcaje con  $^{99}\text{Tc}$  o marcaje con otro isótopo emisor de rayos gamma para marcar anticuerpos anti FT en tumores o complejos de anticuerpo anti FT:FT marcados secundarios (por ejemplo, marcados con FITC) de tumores y pueden capturarse imágenes con una cámara de centelleo gamma (por ejemplo, un dispositivo Elscint Apex 409ECT), típicamente usando colimador de alta resolución, de baja energía, o un colimador multiuso de baja energía. Después pueden evaluarse los tejidos teñidos con respecto a recuento de radiactividad como un indicador de la cantidad de péptidos asociados a FT en el tumor. Las imágenes obtenidas mediante el uso de dichas técnicas pueden usarse para evaluar la biodistribución de FT en un paciente, mamífero o tejido, por ejemplo en el contexto del uso de FT o fragmentos FT como un biomarcador con respecto a la presencia de células cancerosas invasivas. Las variaciones en esta técnica pueden incluir el uso de captura de imágenes por resonancia magnética (IRM) para mejorar la captura de imágenes sobre técnicas de cámara gamma. Se describen métodos y principios de inmunocentelleo similares, por ejemplo, en Srivastava (ed.), *Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy* (Plenum Press 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18ª Edición, Gennaro *et al.*, (eds.), pp. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990), y Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," en *Biotechnology And Pharmacy* 227-49, Pezzuto *et al.*, (eds.) (Chapman y Hall 1993). Dichas imágenes también pueden usarse para el suministro dirigido de otros agentes antineoplásicos, de los que se describen ejemplos en el presente documento (por ejemplo, agentes apoptóticos, toxinas o composiciones quimioterapéuticas de CHOP). Además, dichas imágenes pueden también o como alternativa servir como la base de técnicas quirúrgicas para eliminar tumores. Además, dichas técnicas de captura de imágenes *in vivo* pueden permitir la identificación y localización de un tumor en una situación donde se identifica que un paciente tiene un tumor (debido a la presencia de otros biomarcadores, metástasis, etc.), pero el tumor no puede identificarse por técnicas analíticas tradicionales. Todos estos métodos son elementos de la presente invención y dichos métodos pueden usarse en particular en combinación con tratamiento de un paciente con un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención.

60 La captura de imágenes *in vivo* y otros métodos de diagnóstico proporcionados por la presente invención son particularmente útiles en la detección de micrometástasis en un paciente humano (por ejemplo, un paciente al que no se ha diagnosticado previamente cáncer o un paciente en un periodo de recuperación/remisión de cáncer). Se ha demostrado que las células cancerosas de carcinoma, que componen hasta el 90 % de todas las células cancerosas, por ejemplo, se tiñen muy bien con composiciones de anticuerpo anti FT. La detección con anticuerpos monoclonales anti FT descritos en el presente documento puede ser indicativa de la presencia de carcinomas que

son agresivos/invasivos y también o como alternativa proporcionan un indicio de la viabilidad del uso de anticuerpo monoclonal anti FT relacionado contra dichas micrometástasis.

También se desvela que los anticuerpos anti FT de la presente invención pueden usarse en un método de captura de imágenes *in vivo* donde un anticuerpo anti FT de la presente invención se conjuga con un agente radiopaco promotor de la detección, el anticuerpo conjugado se administra a un hospedador, tal como mediante inyección en el torrente sanguíneo, y se ensaya la presencia y localización del anticuerpo marcado en el hospedador. Mediante esta técnica y cualquier otro método de diagnóstico proporcionado en el presente documento, los anticuerpos anti FT de la presente invención pueden usarse en un método para explorar con respecto a la presencia de células relacionadas con enfermedad en un paciente humano o una muestra biológica tomada de un paciente humano.

Para captura de imágenes de diagnóstico, pueden unirse radioisótopos con un anticuerpo anti FT bien directamente, o bien indirectamente mediante el uso de un grupo funcional intermediario. Los grupos funcionales intermediarios útiles incluyen quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético y ácido dietilentriaminopentaacético (véase por ejemplo documento US 5.057.313).

Además de radioisótopos y agentes radiopacos, pueden realizarse métodos de diagnóstico usando anticuerpos anti FT que se conjugan con colorantes (tales como con el complejo de biotina-estreptavidina), agentes de contraste, compuestos o moléculas fluorescentes y agentes potenciadores (por ejemplo iones paramagnéticos) para captura de imágenes por resonancia magnética (IRM) (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos n.º 6.331.175, que describe técnicas de IRM y la preparación de anticuerpos conjugados con un agente potenciador de IRM). Dichos agentes de diagnóstico/detección pueden seleccionarse de agentes para uso en captura de imágenes por resonancia magnética y compuestos fluorescentes. Para cargar un anticuerpo anti FT con metales radiactivos o iones paramagnéticos, puede ser necesario hacerlo reaccionar con un reactivo que tenga una cola larga con la que se une una multiplicidad de grupos quelantes para unir los iones. Dicha cola puede ser un polímero tal como una polilisina, polisacárido u otra cadena derivatizada o derivatizable que tenga grupos colgantes con los que pueden unirse grupos quelantes tales como, por ejemplo, porfirinas, poliaminas, éteres de corona, bistiosemicarbazonas, polioximas y grupos similares que se sabe que son útiles para este fin. Los quelados pueden acoplarse a anticuerpos anti FT usando químicas convencionales.

Por lo tanto, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpo anti FT de diagnóstico, donde el anticuerpo anti FT está conjugado con un agente de contraste (tal como para capturar imágenes por resonancia magnética, tomografía computarizada o agente potenciador de contraste por ultrasonidos) o un radionúclido que puede ser, por ejemplo, un isótopo emisor gamma, beta, alfa de electrones auger o de positrones.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit para detectar la presencia de antígeno FT, o una célula que expresa FT, en una muestra que comprende

- un anticuerpo anti FT de la invención o una molécula biespecífica de la invención; e
- instrucciones para uso del kit, donde el kit en particular también contiene un anticuerpo anti FT conjugado con un agente de detección o agente de contraste en la presente invención.

En una realización, los anticuerpos anti FT de la presente invención también pueden usarse en un kit para diagnóstico de cáncer que comprende un recipiente que comprende un anticuerpo anti FT, y uno o más reactivos para detectar la unión del anticuerpo anti FT con un péptido FT. Dicho kit puede comprender además en particular un conjugado farmacológico de anticuerpo anti FT de la presente invención. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos u otros marcadores detectables. Los reactivos también pueden incluir anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos para reacciones enzimáticas, donde las reacciones enzimáticas producen un producto que puede visualizarse. En una realización, la presente invención proporciona un kit de diagnóstico que comprende uno o más anticuerpos anti FT, de la presente invención en forma marcada o no marcada en recipiente o recipientes adecuados, reactivos para las incubaciones para un ensayo indirecto y sustratos o agentes de derivatización para la detección en dicho ensayo, dependiendo de la naturaleza del marcador. También pueden incluirse reactivo o reactivos de control e instrucciones para su uso.

También pueden proporcionarse kits de diagnóstico para su uso con un anticuerpo anti FT, tal como un anticuerpo anti FT conjugado/marcado, para la detección de una actividad celular o para detectar la presencia de péptidos FT en una muestra tisular u hospedador. En dichos kits de diagnóstico, así como en kits para usos terapéuticos descritos en otra parte del presente documento, un anticuerpo anti FT típicamente puede proporcionarse en una forma liofilizada en un recipiente, bien solo o bien junto con anticuerpos adicionales específicos para una célula o un péptido diana. Típicamente, también se incluyen un vehículo farmacéutico aceptable (por ejemplo, un diluyente inerte) y/o componentes del mismo, tales como un tampón de Tris, fosfato o carbonato, estabilizadores, conservantes, biocidas, biocidas, proteínas inertes, por ejemplo, albúmina de suero, o similares, (típicamente en un recipiente separado para mezcla) y reactivos adicionales (también típicamente en recipiente o recipientes separados). En ciertos kits, también se incluye un anticuerpo secundario capaz de unirse con el anticuerpo anti FT, que típicamente está presente en un recipiente separado. El segundo anticuerpo está típicamente conjugado con un marcador y formulado de una manera similar al anticuerpo anti FT de la presente invención. Usando los métodos

descritos anteriormente y en otra parte en el presente documento los anticuerpos anti FT pueden usarse para definir subconjuntos de células tumorales/cancerosas y caracterizar dichas células y tejidos/crecimientos relacionados.

Puede conseguirse detección *in situ* retirando una muestra de ensayo histológica de un paciente, y proporcionando la combinación de anticuerpos anti FT marcados (anticuerpo anti FT conjugado con un agente de detección), de la presente invención con dicha muestra de ensayo. El anticuerpo anti FT de la presente invención puede proporcionarse aplicando o solapando el anticuerpo anti FT marcado de la presente invención con una muestra biológica. Mediante el uso de dicho procedimiento, es posible determinar no solamente la presencia de FT o fragmentos de FT sino también la distribución de dichos péptidos en el tejido examinado (por ejemplo, en el contexto de evaluar la propagación de células cancerosas). Usando la presente invención, los expertos habituales percibirán fácilmente que puede modificarse cualquiera de una amplia diversidad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) para conseguir dicha detección *in situ*.

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos que no deberían interpretarse como limitantes adicionales.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Construcciones de expresión para factor tisular (FT)

Se generaron construcciones con codones completamente optimizados para la expresión de FT o sus dominios extracelulares en células HEK, NS0 o CHO. Las proteínas codificadas por estas construcciones son idénticas a la referencia de Genbank NP\_001984 para FT. Las construcciones contenían sitios de restricción adecuados para clonación y una secuencia Kozak óptima (Kozak, 1987). Las construcciones se clonaron en el vector de expresión de mamífero pEE13.4 (Lonza Biologics) (Bebbington, Renner *et al.* 1992), obteniendo pEE13.4TF. Se usó PCR para amplificar la parte que codifica el dominio extracelular (DEC) (aminoácido 1-251) de FT, de la construcción sintética, añadiendo un marcador His C terminal que contiene 6 restos de His (TFECDHis). La construcción se clonó en pEE13.4 y se secuenció completamente para confirmar la corrección de la construcción.

### Ejemplo 2

#### Expresión transitoria en células HEK-293F

Se obtuvieron células 293-F Freestyle™ (un subclón de HEK-293) adaptado para crecimiento en suspensión y medio Freestyle químicamente definido (HEK-293F) de Invitrogen y se transfectaron con el ADN plasmídico apropiado, usando 293fectina (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el caso de la expresión de anticuerpos, se coexpresaron los vectores de cadena pesada y cadena ligera apropiados, como se describe en el Ejemplo 10.

### Ejemplo 3

#### Expresión semiestable en células NS0

Se transfectó de forma estable pEE13.4TF en células NS0 y se seleccionaron clones estables con crecimiento en ausencia de glutamina y en presencia de 7,5  $\mu\text{M}$  de metilsulfoximina (MSX). Se cultivó un grupo de clones en cultivo en suspensión manteniendo al mismo tiempo la presión de selección. Se ensayaron grupos con respecto a la expresión de FT por análisis de FACS y se fijaron para su uso posterior.

### Ejemplo 4

#### Expresión estable en células CHO

Se transfectó de forma estable pEE13.4TF en células CHO-K1SV (Lonza Biologics) y se seleccionaron clones estables con crecimiento en ausencia de glutamina y en presencia de MSX 50  $\mu\text{M}$ . Se seleccionaron clones individuales y se expandieron y ensayaron con respecto a expresión de FT mediante análisis de FACS como se describe posteriormente. Se eligieron clones de alta expresión y se fijaron para su uso posterior.

### Ejemplo 5

#### Purificación de FT marcado con His

Se expresó TFECDHis en células HEK-293F. El marcado de his en TFECDHis permite la purificación con cromatografía de afinidad metálica inmovilizada. En este proceso, un quelante fijado en la resina cromatográfica se carga con cationes  $\text{Co}^{2+}$ . Se incubó sobrenadante que contiene TFECDHis con la resina en modo discontinuo (es decir en solución). La proteína marcada con His se une fuertemente a las perlas de resina, mientras que otras proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo no se unen fuertemente. Después de la incubación las perlas se recuperan del sobrenadante y se envasan en una columna. La columna se lava para retirar proteínas unidas

débilmente. Las proteínas TFECdHis unidas fuertemente se eluyen después con un tampón que contiene imidazol, que compite con la unión de His con  $\text{Co}^{2+}$ . El eluyente se retira de la proteína por intercambio de tampón en una columna de desalación.

## 5 Ejemplo 6

### Procedimiento de inmunización de ratones transgénicos

Los anticuerpos 042, 092-A09, 098 y 101 se obtuvieron de las siguientes inmunizaciones: se inmunizaron tres ratones HCo20 (2 machos y 1 hembra, cepa GG2713), tres ratones HCo17 (2 machos y 1 hembra, cepa GG2714), tres ratones HCo12-BALB/c (3 machos, cepa GG2811), tres ratones HCo7 (3 machos, cepa GG2201) y tres ratones HCo12 (3 machos, cepa GG2198) (Medarex, San José, CA, Estados Unidos; para referencias véase el párrafo sobre ratón HuMab anterior) cada quince días alternando con  $5 \times 10^6$  células NS0-TF transfectadas semiestables o con 20  $\mu\text{g}$  de proteína TFECdHis. Se realizaron en total ocho inmunizaciones, cuatro inmunizaciones intraperitoneales (IP) y cuatro subcutáneas (SC) en la base de la cola. La primera inmunización con células se realizó en adyuvante completo de Freund (CFA, Difco Laboratories, Detroit, MI, Estados Unidos). Para todas las otras inmunizaciones, las células se inyectaron IP en PBS y se inyectó TFECdHis SC usando adyuvante incompleto de Freund (IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, Estados Unidos). Cuando se descubrió que los títulos de suero eran suficientes (dilución de suero de 1/50 o menor hallado positivo en ensayo de exploración específico de antígeno como se describe en el Ejemplo 7 en al menos 2 acontecimientos de exploración bisemanales, secuenciales), los ratones se reforzaron adicionalmente dos veces por vía intravenosa (IV) con 10  $\mu\text{g}$  de proteína TFECdHis en 100  $\mu\text{l}$  de PBS, 4 y 3 días antes de la fusión.

Los anticuerpos 109, 111 y 114 se obtuvieron de las siguientes inmunizaciones: se inmunizaron tres ratones HCo20 (3 hembras), tres ratones HCo17 (3 hembras), tres ratones HCo12-BALB/c (3 hembras), tres ratones HCo7 (3 machos) y tres HCo12 (3 hembras) cada quince días con  $5 \times 10^6$  células NS0-TF transfectadas semiestables. La primera inmunización con células se realizó en CFA, para todas las otras (7) inmunizaciones las células se inyectaron IP en PBS. Cuando se descubrió que los títulos de suero eran suficientes (como se ha definido anteriormente), los ratones se reforzaron adicionalmente dos veces IV con  $1 \times 10^6$  células NS0-TF transfectadas semiestables de forma transitoria en 100  $\mu\text{l}$  de PBS, 4 y 3 días antes de la fusión.

Los anticuerpos 011, 017-D12 y 025 se obtuvieron de las siguientes inmunizaciones: se inmunizaron tres ratones HCo20 (3 machos), tres ratones HCo17 (2 machos y 1 hembra), tres ratones HCo12-BALB/c (3 hembras), tres ratones HCo7 (3 machos) y tres HCo12 (2 machos y 1 hembra) cada quince días con 20  $\mu\text{g}$  de proteína TFECdHis. La primera inmunización (intraperitoneal) con proteína se realizó en CFA, para todas las otras inmunizaciones (7) se inyectó proteína alternando por vía subcutánea y por vía intraperitoneal en IFA. Cuando se descubrió que los títulos de suero eran suficientes (definido como anteriormente), los ratones se reforzaron adicionalmente dos veces por vía intravenosa (IV) con 10  $\mu\text{g}$  de proteína TFECdHis en 100  $\mu\text{l}$  de PBS, 4 y 3 días antes de la fusión.

## 40 Ejemplo 7

### Ensayo de exploración específico de antígeno homogéneo

La presencia de anticuerpos anti FT en sueros de ratones inmunizados o sobrenadante de cultivo de hibridoma o transfectoma de HuMab (anticuerpo monoclonal humano) se determinó por ensayos de exploración específicos de antígeno homogéneos (cuatro cuadrantes) usando Tecnología de Ensayo de Microvolumen Fluorométrico (FMAT; Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos).

Para esto, se usó una combinación de 3 ensayos basados en células y un ensayo basado en perlas. En los ensayos basados en células, se determinó la unión con TH1015-TF (células HEK-293F que expresan de forma transitoria FT, producidas como se ha descrito anteriormente) y A431 (que expresan FT en la superficie celular) así como células HEK293 de tipo silvestre (no expresan FT, control negativo). En el ensayo basado en perlas, se determinó la unión con FT biotinilado acoplado en una perla de estreptavidina (SB1015-TF).

Se añadieron muestras a las células/perlas para permitir la unión con FT. Posteriormente, se detectó la unión de HuMab usando un conjugado fluorescente (anti IgG Humano de Cabra-Cy5; Jackson ImmunoResearch). Se usó anticuerpo de ratón anti FT humano (ERL, acoplado a Alexa-647 en Genmab) como control positivo, se usaron suero agrupado de ratón-HuMab y anticuerpo de ratón-chrompure-Alexa647 como controles negativos. Las muestras se exploraron usando un sistema de detección celular Applied Biosystems 8200 (8200 CDS) y se usó "recuentos x fluorescencia" como lectura.

**Ejemplo 8****Generación de hibridoma de HuMab**

5 Se sacrificaron ratones HuMab con suficiente desarrollo de título específico de antígeno (definido como anteriormente) y se recogieron el bazo y ganglios linfáticos que flanquean la aorta abdominal y la vena cava. Se realizó fusión de esplenocitos y células de ganglios linfáticos con una línea celular de mieloma de ratón mediante electrofusión usando un sistema de electrofusión CEEF 50 (Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, Estados Unidos), esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó selección y cultivo de los hibridomas de  
 10 HuMab resultantes basándose en protocolos convencionales (por ejemplo como se describe en Coligan JE, Bierer, BE, Margulies, DH, Shevach, EM y Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006).

**Ejemplo 9**

15

**Espectrometría de masas de anticuerpos purificados**

Se purificaron alícuotas pequeñas de 0,8 ml de sobrenadante que contiene anticuerpo de plataforma de 6 pocillos o Hyperflask usando columnas PhyTip que contenían resina de Proteína G (PhyNexus Inc., San Jose, Estados Unidos) en una estación de trabajo Sciclone ALH 3000 (Caliper Lifesciences, Hopkinton, Estados Unidos). Las columnas PhyTip se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero los tampones se reemplazaron con: tampón de unión PBS (B. Braun, Medical BV, Oss, Países Bajos) y tampón de elución glicina 0,1 M-HCl pH 2,7 (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Alemania). Después de la purificación, las muestras se neutralizaron con Tris-HCl 2 M, pH 9,0 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). Como alternativa, en algunos casos se purificaron volúmenes mayores de sobrenadante de cultivo usando cromatografía en columna de afinidad de Proteína A.

Después de purificación, las muestras se colocaron en una placa de 384 pocillos (Waters, placa de pocillos cuadrada de 100 µl, parte n.º 186002631). Las muestras se desglucosilaron durante una noche a 37 °C con N-glucosidasa F (Roche cat n.º 11365177001). Se añadió DTT (15 mg/ml) (1 µl/pocillo) y se incubó durante 1 h a  
 30 37 °C. Las muestras (5 o 6 µl) se desalaron en un Acquity UPLC™ (Waters, Milford, Estados Unidos) con una columna BEH300 C18, de 1,7 µm, 2,1x 50 mm a 60 °C. Se usaron agua MQ y acetonitrilo de uso en CL-EM (Biosolve, cat n.º 01204101, Valkenswaard, Países Bajos) con ácido fórmico 0,1 % (Fluka, cat. n.º 56302, Buchs, Alemania), como eluyentes A y B, respectivamente. Se registraron espectros de masas de ionización por electropulverización de tiempo de vuelo en línea en un espectrómetro de masas micrOTOF™ (Bruker, Bremen, Alemania) que operaba en el modo de iones positivos. Antes del análisis, se calibró una escala de 900-3000 m/z con mezcla de ajuste ES (Agilent Technologies, Santa Clara, Estados Unidos). Los espectros de masas se desconvolucionaron con software DataAnalysis™ v. 3.4 (Bruker) usando búsqueda de algoritmo de Entropía Máxima para pesos moleculares entre 5 y 80 kDa.

40 Después de la desconvolución, las masas de cadena pesada y ligera resultantes para todas las muestras se compararon para encontrar anticuerpos por duplicado. En la comparación de las cadenas pesadas se tuvo en cuenta la posible presencia de variantes de lisina C terminal. Esto dio como resultado una lista de anticuerpos únicos, donde único se define como una combinación única de cadenas pesadas y ligeras. En el caso de que se encontraran anticuerpos duplicados, se usaron los resultados de otros ensayos para decidir cuál era el mejor material con el que continuar los experimentos.

El análisis de EM de los pesos moleculares de cadenas pesadas y ligeras de 118 hibridomas específicos de FT produjo 70 anticuerpos únicos (combinación única de cadena pesada/cadena ligera). Estos se caracterizaron en varios ensayos funcionales, identificando los candidatos principales de los inventores, anticuerpos específicos de FT.

50

**Ejemplo 10****Análisis de secuencia de los dominios variables de HuMab anti FT y clonación en vectores de expresión**

55 Se preparó ARN total de los HuMab anti FT a partir de 5x10<sup>6</sup> células de hibridoma y se preparó ADN complementario (ADNc) 5'-RACE a partir de 100 ng de ARN total, usando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se amplificaron regiones codificantes de VH (región variable de cadena pesada) y VL (región variable de cadena ligera) mediante PCR y se clonaron en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) usando el kit de clonación de PCR Zero Blunt (Invitrogen). Para cada HuMab, se secuenciaron 16 clones VL y 8 clones VH. Las secuencias se proporcionan en el Listado de Secuencias y la **Figura**  
 60 **1** en el presente documento.

La **Tabla 1A** y la **Tabla 1B** (a continuación) proporcionan una visión de conjunto de la información de secuencias de anticuerpos y las secuencias de línea germinal más homólogas.

65

**Tabla 1A Homologías de cadena pesada**

Ab	GEN V y alelo	Identidad de REGIÓN V, %	GEN J y alelo	GEN D y alelo	Longitudes de CDR-IMGT
098	IGHV1-69*04	95,49 % (275/288 nt)	IGHJ3*02	IGHD2-21*02	[8,8,11]
011	IGHV3-23*01	96,53 % (278/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD1-26*01	[8,8,11]
017	IGHV3-23*01	98,26 % (283/288 nt)	IGHJ2*01	IGHD2-15*01	[8,8,13]
092	IGHV3-23*01	97,92 % (282/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,11]
101	IGHV3-23*01	95,83 % (276/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,11]
025	IGHV3-30-3*01	97,57 % (281/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,13]
109	IGHV3-30-3*01	96,18 % (277/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,13]
114	IGHV3-33*01 o IGHV3-33*03	94,44 % (272/288 nt)	IGHJ6*02	IGHD3-10*01	[8,8,12]
111	IGHV3-30-3*01	97,57 % (281/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD3-10*01	[8,8,13]
042	IGHV3-23*01	98,26 % (283/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD1-1*01	[8,8,11]

**Tabla 1B Homologías de cadena ligera**

Ab	GEN V y alelo	% de identidad de REGIÓN V (nt)	GEN J y alelo	Longitudes de CDR-IMGT
011	IGKV1D-16*01	98,57 % (275/279 nt)	IGKJ2*01	[6.3.9]
092	IGKV1D-16*01	99,28 % (277/279 nt)	IGKJ2*01	[6.3.10]
098	IGKV1D-16*01	100,00 % (279/279 nt)	IGKJ2*01	[6.3.9]
101	IGKV1D-16*01	100,00 % (279/279 nt)	IGKJ2*01	[6.3.10]
025	IGKV3-11*01	100,00 % (279/279 nt)	IGKJ4*01	[6.3.9]
109	IGKV3-11*01	99,64 % (278/279 nt)	IGKJ4*01	[6.3.9]
017	IGKV3-20*01	99,29 % (280/282 nt)	IGKJ1*01	[7.3.9]
114	IGKV3-20*01	99,65 % (281/282 nt)	IGKJ4*01	[7.3.8]
111	IGKV3-11*01	100,00 % (279/279 nt)	IGKJ4*01	[6.3.9]
042	IGKV3-20*01	99,29 % (280/282 nt)	IGKJ1*01	[7.3.9]

**5 Referencias al listado de secuencias: (secuencias en la figura 1)**

En la figura 1, el clon 017-D12 se denomina "017" y de forma similar el clon 092-A09 se denomina "092".

Región VH	
SEQ ID NO: 1	VH 114
SEQ ID NO: 2	VH 114, CDR1
SEQ ID NO: 3	VH 114, CDR2
SEQ ID NO: 4	VH 114, CDR3
SEQ ID NO: 5	VH 011
SEQ ID NO: 6	VH 011, CDR1
SEQ ID NO: 7	VH 011, CDR2
SEQ ID NO: 8	VH 011, CDR3
SEQ ID NO: 9	VH 017-D12
SEQ ID NO: 10	VH 017-D12, CDR1

## ES 2 647 388 T3

<b>Región VH</b>	
SEQ ID NO: 11	VH 017-D12, CDR2
SEQ ID NO: 12	VH 017-D12, CDR3
SEQ ID NO: 13	VH 042
SEQ ID NO: 14	VH 042, CDR1
SEQ ID NO: 15	VH 042, CDR2
SEQ ID NO: 16	VH 042, CDR3
SEQ ID NO: 17	VH 092-A09
SEQ ID NO: 18	VH 092-A09, CDR1
SEQ ID NO: 19	VH 092-A09, CDR2
SEQ ID NO: 20	VH 092-A09, CDR3
SEQ ID NO: 21	VH 101
SEQ ID NO: 22	VH 101, CDR1
SEQ ID NO: 23	VH 101, CDR2
SEQ ID NO: 24	VH 101, CDR3
SEQ ID NO: 25	VH 025
SEQ ID NO: 26	VH 025, CDR1
SEQ ID NO: 27	VH 025, CDR2
SEQ ID NO: 28	VH 025, CDR3
SEQ ID NO: 29	VH 109
SEQ ID NO: 30	VH 109, CDR1
SEQ ID NO: 31	VH 109, CDR2
SEQ ID NO: 32	VH 109, CDR3
SEQ ID NO: 33	VH 098
SEQ ID NO: 34	VH 098, CDR1
SEQ ID NO: 35	VH 098, CDR2
SEQ ID NO: 36	VH 098, CDR3
SEQ ID NO: 37	VH 111
SEQ ID NO: 38	VH 111, CDR1
SEQ ID NO: 39	VH 111, CDR2
SEQ ID NO: 40	VH 111, CDR3
SEQ ID NO: 41	VL 114
SEQ ID NO: 42	VL 114, CDR1
SEQ ID NO: 43	VL 114, CDR2
SEQ ID NO: 44	VL 114, CDR3
SEQ ID NO: 45	VL 011
SEQ ID NO: 46	VL 011, CDR1
SEQ ID NO: 47	VL 011, CDR2

ES 2 647 388 T3

<b>Región VH</b>	
SEQ ID NO: 48	VL 011, CDR3
SEQ ID NO: 49	VL 017-D12
SEQ ID NO: 50	VL 017-D12, CDR1
SEQ ID NO: 51	VL 017-D12, CDR2
SEQ ID NO: 52	VL 017-D12, CDR3
SEQ ID NO: 53	VL 042
SEQ ID NO: 54	VL 042, CDR1
SEQ ID NO: 55	VL 042, CDR2
SEQ ID NO: 56	VL 042, CDR3
SEQ ID NO: 57	VL 092-A09
SEQ ID NO: 58	VL 092-A09, CDR1
SEQ ID NO: 59	VL 092-A09, CDR2
SEQ ID NO: 60	VL 092-A09, CDR3
SEQ ID NO: 61	VL 101
SEQ ID NO: 62	VL 101, CDR1
SEQ ID NO: 63	VL 101, CDR2
SEQ ID NO: 64	VL 101, CDR3
SEQ ID NO: 65	VL 025
SEQ ID NO: 66	VL 025, CDR1
SEQ ID NO: 67	VL 025, CDR2
SEQ ID NO: 68	VL 025, CDR3
SEQ ID NO: 69	VL 109
SEQ ID NO: 70	VL 109, CDR1
SEQ ID NO: 71	VL 109, CDR2
SEQ ID NO: 72	VL 109, CDR3
SEQ ID NO: 73	VL 098
SEQ ID NO: 74	VL 098, CDR1
SEQ ID NO: 75	VL 098, CDR2
SEQ ID NO: 76	VL 098, CDR3
SEQ ID NO: 77	VL 111
SEQ ID NO: 78	VL 111, CDR1
SEQ ID NO: 79	VL 111, CDR2
SEQ ID NO: 80	VL 111, CDR3

El HuMab anti FT 092-A09 es un anticuerpo IgG1, $\kappa$  monoclonal completamente humano, de longitud completa, que comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 17 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 57.

- 5 El HuMab anti FT 101 es un anticuerpo IgG1, $\kappa$  monoclonal completamente humano de longitud completa que comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 21 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 61.

El HuMab anti FT 025 es un anticuerpo monoclonal IgG1,k completamente humano de longitud completa que comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 25 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 65.

5 El HuMab anti FT 109 es un anticuerpo monoclonal IgG1,k completamente humano de longitud completa que comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 29 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 69.

El HuMab anti FT 017-D12 es un anticuerpo monoclonal IgG1,k completamente humano de longitud completa que comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 9 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 49.

10 El HuMab anti FT 114 es un anticuerpo monoclonal IgG1,k completamente humano de longitud completa que comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 1 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 41.

El HuMab anti FT 042 es un anticuerpo monoclonal IgG1,k completamente humano de longitud completa que comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 13 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 53.

15 El HuMab anti FT 011 es un anticuerpo monoclonal IgG1,k completamente humano de longitud completa que comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 5 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 45.

20 El HuMab anti FT 098 es un anticuerpo monoclonal IgG1,k completamente humano de longitud completa que comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 33 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 73.

El HuMab anti FT 111 es un anticuerpo monoclonal IgG1,k completamente humano de longitud completa que comprende la secuencia de VH de SEQ ID NO: 37 y la secuencia de VL de SEQ ID NO: 77.

## 25 Ejemplo 11

### Purificación de anticuerpos

30 El sobrenadante de cultivo se filtró sobre filtros sin salida de 0,2 µm y se cargó en columnas de Proteína A de 5 ml (rProtein A FF, Amersham Bioscience) y se eluyó con ácido cítrico 0,1 M-NaOH, pH 3. El eluato se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2 M, pH 9 y se dializó durante una noche con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun). Después de la diálisis las muestras se esterilizaron por filtración sobre filtros sin salida de 0,2 µm. La pureza se determinó mediante SDS-PAGE y la concentración se midió por nefelometría y absorbancia a 280 nm. Se separaron en alícuotas anticuerpos purificados y se almacenaron a -80 °C. Una vez descongeladas, las alícuotas de anticuerpos purificados se mantuvieron a 4 °C. Se realizó espectrometría de masas para identificar la masa molecular de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo expresadas por los hibridomas como se describe en el Ejemplo 9.

## 40 Ejemplo 12

### Unión de HuMab anti FT con el dominio extracelular de FT en ELISA

45 La especificidad de los HuMab anti FT se evaluó mediante ELISA. Se recubrieron placas de ELISA (Microlon; Greiner Bio-One) durante una noche a +4 °C con 0,5 µg/ml de TFECdHis en PBS, pH 7,4. Las placas de ELISA recubiertas se vaciaron y se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente con suero de pollo al 2 % (v/v) (Gibco, Paisley, Escocia) en PBS y se lavaron con PBS que contenía Tween 20 0,05 % (PBST). Posteriormente, se incubaron HuMab, diluidos en serie en PBSTC (PBS complementado con suero de pollo al 2 % (v/v) y Tween-20 0,05 % (v/v)), durante 1 hora a TA en condiciones de agitación (300 rpm). Se detectaron HuMab unidos usando anticuerpos de cabra anti IgG humanos conjugados con HRP (Jackson ImmunoResearch) diluidos 1:5.000 en PBSTC, que se incubaron durante 1 hora a TA en condiciones de agitación (300 rpm). La reacción se desarrolló adicionalmente con ABTS (Roche Diagnostics) a TA en oscuridad, se detuvo después de 15-30 minutos añadiendo ácido oxálico 2 % (p/v) y después se midió la absorbancia a 405 nm. Se usó HuMab-KLH (un anticuerpo monoclonal humano contra KLH (hemocianina de lapa californiana)), como control negativo. Se usó anti FT humano (ERL) de ratón como control positivo (anti IgG de ratón marcado con HRP como conjugado). Las curvas de unión se analizaron usando regresión no lineal (respuesta de dosis sigmoidea con pendiente variable) usando software GraphPad Prism V4.03.

60 Como puede verse en la Figura 3, todos los anticuerpos anti FT se unieron con TFECdHis. Los valores de CE<sub>50</sub> para los HuMab son la media de 3 experimentos y variaron entre 0,13 y 0,17 nM (Tabla 2 posterior).

Tabla 2:

FT HuMab	CE <sub>50</sub> nM
11	0,16
017-D12	0,25

FT HuMab	CE <sub>50</sub> nM
42	0,23
092-A09	0,18
101	0,28
98	0,13
114	0,17
25	0,34
109	0,27

### Ejemplo 13

#### Unión de HuMab anti FT a FT unido a membrana

- 5 La unión de HuMab anti FT a FT unido a membrana se determinó mediante análisis de FACS, usando células CHO transfectadas con FT o líneas celulares tumorales que expresaban FT MDA-MB-231, A431 (transfectadas con luciferasa) y Bx-PC3.
- 10 Las células se resuspendieron en PBS ( $2 \times 10^6$  células/ml), se pusieron en placas de fondo en V de 96 pocillos (50  $\mu$ l/pocillo). Se añadieron 50  $\mu$ l de HuMab diluido en serie en tampón FACS (PBS complementado con BSA 0,1 % y azida Na 0,02 %) a las células y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Después de lavar tres veces con tampón FACS, se añadieron 50  $\mu$ l de IgGfc de cabra antihumano conjugado con ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch), diluido 1:100 en tampón de FACS. Después de 30 minutos en hielo (en la oscuridad), las células
- 15 se lavaron tres veces y se detectó la unión específica de los HuMab por citometría de flujo en un FACSCalibur (BD Biosciences). Se usó HuMab-KLH como control negativo. Se usó anti FT de ratón seguido de anti IgGfc de ratón conjugado con PE como control positivo. Las curvas de unión se analizaron usando regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) usando software GraphPad Prism V4.03 (Software GraphPad, San Diego, CA, Estados Unidos).
- 20 La Figura 4 muestra un ejemplo de curvas de unión de HuMab específicos de FT con células MDA-MB-231. La Tabla 3 proporciona una visión de conjunto de valores de CE<sub>50</sub> de unión de HuMab específicos de FT con células CHO transfectadas con FT (S1015-TF), MDA-MB-231, A431 y Bx-PC3.

25 **Tabla 3 - Visión de conjunto de valores de CE<sub>50</sub> e intensidad de fluorescencia media máxima (IFM máx.) determinados por análisis de FACS de la unión de HuMab específicos de FT con diferentes tipos celulares.**

		MDA-MB-231		Bx-PC3		A431		S1015-TF-012	
grupo	HuMab FT	CE <sub>50</sub>	IFM Máx						
I	13	1,58	2451	1,86	1305	8,04	3622	1,07	5207
I	44	0,87	1881	1,88	1136	1,45	2646	2,13	5021
I	87-Lg6	8,28	1107	7,19	1030	nt	nt	nt	nt
II	11	0,47	2143	1,01	1280	0,20	2606	1,32	5654
II	017-D12	1,33	2401	1,61	1422	1,24	3296	1,21	5792
II	42	0,25	1518	2,45	1701	nt	nt	nt	nt
II	092-A09	0,53	2290	0,84	1262	0,83	3137	1,32	5409
II	101	0,85	2071	2,25	1220	3,16	2934	1,77	5859
II/III	98	0,99	1956	1,38	1151	1,40	2755	0,96	5229
II/III	114	0,47	2438	0,80	1407	0,90	3433	1,72	6095
III	3	3,20	1798	4,98	1106	6,94	2530	2,06	4247
III	25	0,69	2254	0,88	1320	5,19	3170	0,73	5808

		MDA-MB-231		Bx-PC3		A431		S1015-TF-012	
grupo	HuMab FT	CE <sub>50</sub>	IFM Máx						
III	109	2,16	2052	4,04	1324	1,74	3124	0,92	5629
III	111	1,03	1774	1,83	1128	2,88	3043	0,55	5353

Los valores de CE<sub>50</sub> están en nM. La IFM Máx para células MDA-MB-231, BxPC3 y A431 a 30 µg/ml de anticuerpo, para S1015-TF a 7,5 µg/ml de anticuerpo.

## 5 Ejemplo 14

### Inhibición de la unión de FVIIa con FT

Se midió la inhibición de unión de FVIIa con FT, en células MDA-MB-231, por HuMab anti FT mediante análisis de FACS. Las células MDA-MB-231 se lavaron en PBS para retirar suero y se sembraron en placas de 96 pocillos (100.000 células por pocillo). Las células se incubaron con HuMab anti FT en DMEM/BSA 0,1 % durante 15 min, seguido de incubación con FVIIa 100 nM en DMEM/BSA 0,1 % a 4 °C durante 30 min. Las células se lavaron con PBS/BSA 0,1 %/azida sódica 0,02 % (tampón de FACS) y se incubaron con 10 µg/ml de anti FVIIa de conejo (Abcam [ab7053]). Las células se lavaron con tampón de FACS y se incubaron con anti IgG de conejo de cabra marcado con PE diluido 1:50 (Jackson [111-116-144]). Las células se lavaron con tampón de FACS y se midió la intensidad de fluorescencia media (IFM) en un FACSCanto II (Becton Dickinson).

La concentración de anticuerpo necesaria para obtener 50 % de inhibición (CI<sub>50</sub>) se calculó usando GraphPad Prism (análisis de regresión no lineal).

La **Figura 5** y la **Tabla 4** muestran que HuMab-TF-098 (CI<sub>50</sub>: 1,2 µg/ml), -114 (la CI<sub>50</sub> no pudo determinarse) y -011 (CI<sub>50</sub>: 0,6 µg/ml) inhibieron eficazmente la unión de FVIIa con células MDA-MB-231, mientras que HuMab-TF-013, -044 y -111 no (o en un grado mucho menor) inhiben la unión de FVIIa.

25 **Tabla 4 - visión de conjunto de valores de CI<sub>50</sub> de HuMab anti FT para inhibir la unión a FVIIa.**

Anticuerpo (HuMab-FT)	CI <sub>50</sub>
098	1,218
111	ND <sup>a)</sup>
013	ND <sup>a)</sup>
044	ND <sup>a)</sup>
114	ND <sup>a)</sup>
011	0,6472
a) no pudo calcularse	

Los datos mostrados son valores de CI<sub>50</sub> (en µg/ml) de HuMab anti FT para inhibir la unión de FVIIa 100 nM con FT en células MDA-MB-231, medidos en un experimento representativo.

## 30 Ejemplo 15

### Internalización mediada por anticuerpos y destrucción de células por HuMab anti FT en un ensayo anti kappa-ETA'

35 Para determinar si los HuMab anti FT son adecuados para un enfoque de conjugado de anticuerpo-fármaco, se usó un ensayo de destrucción basado en células *in vitro* usando exotoxina A de pseudomonas dirigida a kappa (anti kappa-ETA'). En este ensayo se usó un dominio de anti cadena ligera kappa humano de alta afinidad conjugado con una forma truncada de la exotoxina A de pseudomonas. Tras la internalización, el conjugado de anticuerpo-dominio anti kappa-ETA' experimenta proteólisis y reducción de enlaces disulfuro, separando el dominio catalítico y el de unión. El dominio catalítico se transporta del sistema de Golgi al retículo endoplásmico mediante el motivo de retención KDEL y posteriormente se transloca al citosol donde inhibe la síntesis de proteínas e induce la apoptosis (Kreitman RJ. BioDrugs. 2009; 23 (1): 1-13. Recombinant Immunotoxins Containing Truncated Bacterial Toxins for the Treatment of Hematologic Malignancies).

Se ensayó internalización mediada por anticuerpos y destrucción celular por la toxina para diferentes HuMab anti FT. Se ensayaron tres líneas celulares diferentes, con niveles comparables de expresión de FT. Estas células también expresaron EGFR (a diferentes niveles), permitiendo el uso de un anticuerpo de control positivo (2F8), que se une con EGFR y se sabe que induce internalización de EGFR. El número de FT y moléculas de EGFR expresadas en las líneas celulares se determinó por el kit Qifi (Dako, Glostrup, Dinamarca); células A431: moléculas de FT promedio por célula aproximadamente 500.000, moléculas de EGFR promedio por célula aproximadamente 500.000; BxPC3: moléculas de FT promedio por célula aproximadamente 500.000, moléculas de EGFR promedio por célula aproximadamente 200.000; MDA-MB-231: moléculas de FT promedio por célula aproximadamente 500.000, moléculas de EGFR promedio por célula aproximadamente 100.000. Las células se sembraron en concentración óptima (A431: 2.500 células/pocillo, BxPC3: 3.000 células/pocillo, MDA-MB-231: 5.000 células/pocillo) en medio de cultivo celular en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Greiner Bio-one) y se permitió que se adhirieran. Para identificar HuMab anti FT que permitan la internalización de y destrucción por la toxina, se incubó una concentración fija (0,5 µg/ml [A431 y BxPC3]; 0,25 µg/ml [MDA-MB-231]) de anti kappa-ETA', que no indujo muerte celular no específica en ausencia de anticuerpo, durante 30 minutos con una cantidad valorada de HuMab anti FT antes de la adición a las células. Después de tres días, la cantidad de células viables se cuantificó con AlamarBlue (BioSource International, San Francisco, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se supervisó usando el lector Multimarcador EnVision 2101 (PerkinElmer, Turku, Finlandia) con ajustes de AlamarBlue convencionales. Se incluyó 2F8 con el anti kappa-ETA' como un control positivo. Se usó un anticuerpo de control de isotipo (IgG1-b12) como control negativo.

La **Figura 6** y la **Tabla 5** muestran que todos excepto uno (HuMab-TF-087) de los HuMab anti FT preincubados con anti Kappa-ETA' fueron capaces de destruir células A431, BxPC3 y MDA-MB-231 de una manera dependiente de dosis. HuMab preincubado con anti kappa-ETA' TF-098, -114 y -011 indujeron destrucción más eficaz (CE<sub>50</sub> entre 9 x 10<sup>-5</sup> y 4 x 10<sup>-4</sup> µg/ml en células A431) que HuMab preincubado con anti kappa-ETA' TF-013, -111 y -044 (CE<sub>50</sub> entre 2,0 x 10<sup>-2</sup> y 9,8 x 10<sup>-2</sup> µg/ml en células A431). HuMab-TF-087 preincubado con anti kappa-ETA' no indujo destrucción celular.

Se muestra un experimento representativo para cada línea celular: A431 (a), BxPC3 (b) y MDA-MB-231 (c). Los datos mostrados son intensidades de fluorescencia medias (IFM) ± E.T.M. de pocillos por triplicado de células tratadas con HuMab anti FT preincubados con anti kappa-ETA'. La línea discontinua superior indica la señal máxima obtenida en ausencia de HuMab anti FT preincubados con anti kappa-ETA'; la línea discontinua inferior indica destrucción máxima obtenida con estaurosporina.

**Tabla 5 - visión de conjunto de valores de CE<sub>50</sub> y porcentajes de destrucción celular inducidos por HuMab anti FT preincubados con anti kappa-ETA'.**

Anticuerpo (HuMab-FT-)	A431		BxPC3		MDA-MB-231	
	% de destrucción	CE <sub>50</sub> µg/ ml	% de destrucción	CE <sub>50</sub> µg/ ml	% de destrucción	CE <sub>50</sub> µg/ ml
098	95	9,0 x 10 <sup>-5</sup>	99	1,3 x 10 <sup>-5</sup>	96	7,2 x 10 <sup>-4</sup>
111	92	3,4 x 10 <sup>-2</sup>	98	1,5 x 10 <sup>-2</sup>	88	2,3 x 10 <sup>-2</sup>
013	80	2,0 x 10 <sup>-2</sup>	96	9,4 x 10 <sup>-3</sup>	56	N.D. <sup>a</sup>
044	66	9,8 x 10 <sup>-2</sup>	96	1,5 x 10 <sup>-2</sup>	44	N.D. <sup>a</sup>
087	3	N.D. <sup>a</sup>	56	N.D. <sup>a</sup>	8	N.D. <sup>a</sup>
114	97	2,6 x 10 <sup>-4</sup>	99	7,3 x 10 <sup>-4</sup>	99	2,5 x 10 <sup>-3</sup>
011	96	3,9 x 10 <sup>-4</sup>	98	2,6 x 10 <sup>-4</sup>	88	3,0 x 10 <sup>-3</sup>
2F8	99	7,1 x 10 <sup>-6</sup>	98	3,5 x 10 <sup>-5</sup>	84	1,5 x 10 <sup>-3</sup>
B12	5	N.D. <sup>a</sup>	22	N.D. <sup>a</sup>	0	N.D. <sup>a</sup>

a) No pudo calcularse.

Los datos mostrados son valores de CE<sub>50</sub> (en µg/ml) y porcentajes máximos de destrucción de las líneas celulares indicadas tratadas con HuMab anti FT preincubados con anti kappa-ETA', medidos en un experimento representativo. El porcentaje de destrucción celular (% de destrucción) se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{(IFM_{\text{no tratado}} - IFM_{\text{tratado con HuMab conjugado}})}{(IFM_{\text{no tratado}} - IFM_{\text{tratado con estaurosporina}})}$$

**Ejemplo 16****Reparación de ADC anti FT**

- 5 Se produjeron HuMab-011, HuMab-098 y HuMab-111 y el IgG1-b12 de control negativo de forma transitoria en células HEK-293F (HuMab-011, HuMab-111 e IgG1-b12) o usando una línea celular CHO estable (HuMab-098). Los anticuerpos se purificaron por cromatografía de Proteína A de acuerdo con procedimientos convencionales, produciendo finalmente aproximadamente 400 mg de anticuerpo purificado. A continuación, los anticuerpos se conjugaron con vcMMAE y mcMMAF, respectivamente. Se conjugaron aproximadamente 200 mg de HuMab-011, 10 HuMab-098 o HuMab-111 con vcMMAE o mcMMAF. El enlazador farmacológico vcMMAE o mcMMAF se alquiló con las cisteínas de los anticuerpos reducidos de acuerdo con procedimientos descritos en la bibliografía (Sun *et al.* (2005) Bioconjugate Chem. 16: 1282-1290; McDonagh *et al.*, (2006) Protein Eng. Design Sel. 19: 299-307; Alley *et al.*, (2008) Bioconjugate Chem. 19: 759-765). La reacción se detuvo mediante la adición de un exceso de N-acetilcisteína. Se retiró cualquier fármaco no conjugado residual por purificación y los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT se formularon en PBS. Los conjugados farmacológicos de anticuerpo anti FT se analizaron 15 posteriormente con respecto a concentración (por absorbancia a 280 nm), la relación de fármaco con respecto a anticuerpo (la "DAR") por cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), la cantidad de fármaco no conjugado (por cromatografía de fase inversa), el porcentaje de agregación (por cromatografía de exclusión por tamaño, SEC-HPLC) y los niveles de endotoxina (por LAL). Los resultados se 20 muestran a continuación en la tabla 6.

Tabla 6 - visión de conjunto de diferentes características de los conjugados de anticuerpo-fármaco

Ensayo	HuMab-TF-011		HuMab-TF-098		HuMab-TF-111		IgG1-b12	
	vcMMAE	mcMMAF	vcMMAE	mcMMAF	vcMMAE	mcMMAF	vcMMAE	mcMMAF
Concentración (mg/ml)	10,69	9,86	9,28	10,96	9,83	10,4	5,49	8,74
DAR por RP-HPLC	3,9	3,9	3,9	4,0	4,3	4,1	3,6	3,9
DAR por HIC	3,9	4,1	3,7	3,9	4,1	4,2	3,4	3,9
% de fármaco no conjugado	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
% de agregado por SEC-HPLC	5,3	5,3	0,8	0,7	1,2	0,8	0,6	1,0
Endotoxina	0,2	0,2	0,131	<0,05	0,07	0,07	0,05	<0,05

**Ejemplo 17****Unión de los ADC anti FT con dominio extracelular recombinante de FT, determinado por ELISA**

5 Se midió la unión de los ADC anti FT con FT mediante ELISA (recubierto con dominio extracelular recombinante de FT) y se comparó con la unión de HuMab anti FT no conjugados. Se recubrieron placas de ELISA (Greiner BioOne) durante una noche a 4 °C con 1,25 µg/ml, 100 µl por pocillo, de TFECDis recombinante en PBS (B. Braun Melsungen AG). Las placas de ELISA se lavaron tres veces con PBS que contenía Tween-20 0,05 % (PBST), se bloquearon con 200 µl/pocillo de PBST a TA durante 1 h con agitación (300 rpm), se lavaron tres veces con PBST y se vaciaron. Posteriormente, se añadieron 100 µl de ADC anti FT o HuMab anti FT no conjugados en diluciones en serie en PBST y se incubaron con agitación a TA durante 90 min. Las placas de ELISA se lavaron tres veces con PBST y se vaciaron. Se detectaron ADC anti FT unidos y HuMab no conjugados mediante la adición de anti IgG1 humano de ratón conjugado con HRP (100 µl; 0,015 µg/ml; Sanquin; n.º M1328) en tampón de ensayo e incubación con agitación a TA durante 1 h. Las placas se lavaron tres veces con PBST, se vaciaron y se incubaron con 100 µl de solución de ABTS (50 ml de tampón ABTS [Roche] y un comprimido de ABTS [50 mg; Roche]). Después de incubación en oscuridad a TA durante 30 min, la reacción se detuvo por incubación con 100 µl por pocillo de ácido oxálico (2 % [p/v]; Riedel de Haen) en oscuridad, durante 10 min. Las placas se midieron a DO 405 nm en un lector de ELISA (Biotek Instruments, Lector de Microplacas de Absorbancia EL808).

20 IgG1-b12, un anticuerpo que se une con un antígeno no relacionado, se usó como un control negativo (tanto no conjugado como en formato ADC).

25 Se analizaron curvas de unión por regresión no lineal (respuesta de dosis sigmoidea con pendiente variable) usando software GraphPad Prism 5 (Software GraphPad, San Diego, CA, Estados Unidos). La **Figura 7** muestra curvas de unión que demuestran que todos los HuMab anti FT y ADC se unieron dentro de un intervalo similar al dominio extracelular de FT en un ELISA (valores de CE<sub>50</sub> entre 370 y 470 ng/ml).

30 La **Tabla 7** muestra valores de CE<sub>50</sub> de HuMab anti FT y ADC para unión con el dominio extracelular de FT. Los valores de CE<sub>50</sub> están en ng/ml.

**Tabla 7 - Visión de conjunto de valores de CE<sub>50</sub> para unión de HuMab específicos de FT y ADC con el dominio extracelular de FT, determinados por ELISA**

HuMab-TF-	CE <sub>50</sub> (ELISA)		
	No conjugado	vcMMAE	mcMMAF
011	373	469	431
098	422	426	401
111	377	464	416

**Ejemplo 18****Internalización mediada por anticuerpos y destrucción celular por ADC anti FT en un ensayo de destrucción *in vitro***

40 Para determinar la capacidad de los ADC anti FT para inducir citotoxicidad, se realizó un ensayo de destrucción basado en células *in vitro*.

45 Se ensayó la destrucción de células de tres líneas celulares para diferentes ADC anti FT. Se obtuvieron células A431 de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ: ACC91), se obtuvieron células HPAF-II y NCI-H441 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC: CRL-1997 y HTB-174). Las células se sembraron en concentración óptima (A431: 2,5 x 10<sup>3</sup> células/pocillo, HPAF-II y NCI-H441: 5 x 10<sup>3</sup> células/pocillo) en medio de cultivo celular en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (Greiner Bio-one) y se permitió que se adhirieran. Se añadieron diluciones en serie de ADC anti FT y se incubaron a 37 °C durante 72 h (A431 y HPAF-II) o 96 h (NCI-H441). La cantidad de células viables se cuantificó con AlamarBlue (BioSource International, San Francisco, Estados Unidos), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se supervisó usando el lector Multimarcador EnVision 2101 (PerkinElmer, Turku, Finlandia) con ajustes de AlamarBlue convencionales. Se usaron ADC IgG1-b12 (un anticuerpo que se une a un antígeno no relacionado) como controles negativos. Se usó estaurosporina (Sigma, n.º S6942) para inducir destrucción celular máxima.

55 Las líneas celulares A431 y HPAF-II expresan ambas más de 200.000 moléculas de factor tisular por célula y puede considerarse por lo tanto que expresan altos niveles de factor tisular.

Las células NCI-H441 expresan aproximadamente 80.000 moléculas de factor tisular por célula y puede por lo tanto considerarse que expresan niveles intermedios de factor tisular.

La **Figura 8** y la **Tabla 8** muestran que todos los ADC anti FT fueron capaces de destruir células A431, HPAF-II y NCI-H441 de una manera dependiente de dosis. HuMab-TF-098 y -011 indujeron destrucción ligeramente más eficaz (CI<sub>50</sub> entre 9 y 22 ng/ml en células A431, entre 1 y 5 ng/ml en células HPAF-II y entre 1 y 10 ng/ml en células NCI-H441) que HuMab-TF-111 (CI<sub>50</sub> entre 46 y 83 ng/ml en células A431, entre 4 y 15 ng/ml en células HPAF-II y 416 ng/ml en células NCI-H441). Se muestra un experimento representativo para cada línea celular: A431 (a) y HPAF-II (b). Los datos mostrados son porcentajes de supervivencia ± E.T.M. de pocillos por duplicado de células tratadas con ADC anti FT.

**Tabla 8 - visión de conjunto de valores de CI<sub>50</sub> y porcentajes de destrucción celular inducidos por ADC anti FT.**

ADC (HuMab-TF-)	A431		HPAF-II		NCI-H441	
	% de destrucción	CI <sub>50</sub>	% de destrucción	CI <sub>50</sub>	% de destrucción	CI <sub>50</sub>
098-vcMMAE	92	9	71	1	60	10
098-mcMMAF	85	13	73	5	63	4
011-vcMMAE	93	10	71	3	60	10
011-mcMMAF	78	22	72	5	53	5
111-vcMMAE	90	46	73	4	51	416
111-mcMMAF	73	83	74	15	62	416
IgG1-b12-vcMMAE	0	N.D. <sup>a)</sup>	0	N.D. <sup>a)</sup>	0	N.D. <sup>a)</sup>
IgG1-b12-mcMMAF	0	N.D. <sup>a)</sup>	0	N.D. <sup>a)</sup>	0	N.D. <sup>a)</sup>

a) No pudo calcularse.

Los datos mostrados son valores de CI<sub>50</sub> (en ng/ml) y porcentajes máximos de destrucción (a una concentración de 10 µg/ml) de las líneas celulares indicadas tratadas con ADC anti FT, medidos en un experimento representativo. El porcentaje de destrucción celular (% de destrucción) se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{(IFM_{\text{no tratado}} - IFM_{\text{tratado con ADC anti FT}})}{(IFM_{\text{no tratado}} - IFM_{\text{tratado con estaurosporina}})} \times 100\%$$

#### Ejemplo 19

#### Tratamiento terapéutico de xenoinjertos tumorales de A431 y HPAF-II en ratones SCID con ADC anti FT

Se determinó la eficacia *in vivo* de ADC anti FT en tumores de xenoinjerto A431 y HPAF-II subcutáneos (SC) establecidos en ratones SCID. Se inyectaron  $5 \times 10^6$  células A431 (obtenidas de DSMZ) o  $2 \times 10^6$  HPAF-II (obtenidas de ATCC) en 200 µl de PBS SC en el flanco derecho de ratones SCID hembra, seguido de cuatro inyecciones con ADC anti FT o controles (IgG1-b12; tanto como ADC como no conjugados), comenzando cuando los tamaños tumorales eran de aproximadamente 200-250 mm<sup>3</sup> para xenoinjertos de A431: día 11, día 14, día 18 y día 21 o aproximadamente 100-150 mm<sup>3</sup> para xenoinjertos HPAF-II: día 13, 16, 20 y 23 (60 µg/ratón en 100 µl, por vía intraperitoneal (IP)). El volumen tumoral se determinó al menos dos veces por semana. Se calcularon volúmenes tumorales (mm<sup>3</sup>) a partir de mediciones de calibrador (PLEXX) como:  $0,52 \times (\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2$ .

La **Figura 9** muestra que todos los ADC anti FT fueron eficaces en la inhibición del crecimiento tumoral de tumores establecidos s.c. A431 (a) y HPAF-II (b). Los datos mostrados son volúmenes tumorales medios ± E.T.M. por grupo (n = 7 ratones por grupo). En el modelo de HPAF-II, los conjugados de vcMMAE fueron significativamente más eficaces en la inhibición del crecimiento tumoral que los conjugados mcMMAF.

#### Ejemplo 20

#### Estabilidad de ADC clones candidatos anti FT y ADC IgG1-b12

La estabilidad de los materiales conjugados con MMAE y MMAF se ensayaron tras el almacenamiento durante 10 días, 1, 2 y 3 meses a < -65 °C y 5 °C. En este ejemplo solamente se muestran los datos de tres meses, ya que se

obtuvieron resultados similares para todos los puntos temporales intermedios. Además, la estabilidad de los materiales se ensayó tras ciclos repetidos de congelación-descongelación.

5 Se sometieron a ultracongelación lotes de ADC preparados (cuatro lotes de IgG cada uno conjugado con dos  
 10 enlazadores diferentes, Tabla 6). Para ensayar la estabilidad, los lotes se descongelaron y se diluyeron hasta  
 1 mg/ml en PBS. El material diluido se separó en alícuotas en partes de 300  $\mu$ l en crioviales y los viales se colocaron  
 a  $< -65$  °C o 5 °C para almacenamiento a temperatura. Para congelación-descongelación, se congelaron tres viales  
 de cada lote a  $< -65$  °C, durante una noche, y después se descongelaron sin ayuda a TA. El ciclo de congelación-  
 descongelación se repitió otras dos veces (las muestras se congelaron-descongelaron tres veces en total). Todos los  
 materiales se analizaron al comienzo del estudio (t=0) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida de  
 dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HP-SEC) y unión al  
 factor tisular (TFECDHis) en un ELISA de unión. Se realizaron los mismos análisis para muestras almacenadas  
 durante tres meses (t=3 meses) a  $< -65$  °C y 5 °C y para muestras de congelación-descongelación.

15 Se realizó SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras en geles Bis-Tris NuPAGE 4-12 % (Invitrogen,  
 Breda, Países Bajos) usando un método de Laemli modificado (Laemli 1970 Nature 227 (5259): 680-5), donde las  
 muestras se procesaron a pH neutro. Los geles de SDS-PAGE se tiñeron con Coomassie y se capturaron imágenes  
 digitales usando un Sistema de Captura de Imágenes Óptico (Isogen Life Science).

20 Se realizó HP-SEC usando una unidad de separación Waters Alliance 2695 o 2795 (Waters, Etten-Leur, Países  
 Bajos) conectada a una columna de HP-SEC TSK (G3000SWxl; Tosoh Bioscience, via Omnilabo, Breda, Países  
 Bajos) y un detector de absorbancia  $\lambda$  doble Waters 2487 (Waters). Las muestras se procesaron a 1 ml/min. Los  
 resultados se procesaron usando software Empower versión 2 y se expresaron por pico como porcentaje de altura  
 de pico total.

25 Se analizó la unión a proteína recombinante del dominio extracelular de FT mediante ELISA, como se ha descrito  
 anteriormente en el ejemplo 17.

30 La Figura 10 a-d muestra análisis de SDS-PAGE de clones candidatos anti FT conjugados y no conjugados e IgG1-  
 b12 al comienzo del estudio de estabilidad (t=0). En SDS-PAGE no reductor (a, b), IgG1 no conjugado migró como  
 una banda de IgG intacta de aproximadamente 150 kDa. Como se esperaba, los ADC se disocian en gran medida  
 en fragmentos de IgG de tamaños más pequeños (125 kDa = HHL, 99 kDa = HH, 67 kDa = HL, 51 kDa = H y 25 kDa  
 = L), debido a las condiciones de SDS-PAGE desnaturizantes y la naturaleza no covalente de las moléculas de  
 ADC (enlaces disulfuro rotos) (Figura 10 a, b). El análisis de SDS-PAGE reducido (Figura 10c,d) mostró bandas de  
 35 la cadena ligera no conjugada (L0) y cadena ligera con un fármaco (MMAE o MMAF) unido (L1). Se observó  
 resolución parcial para la cadena pesada no conjugada (H0) y las formas conjugadas con MMAE (H1, H2 y H3). Las  
 formas de cadena pesada conjugadas y no conjugadas con MMAF no pudieron resolverse bien pero aparecían  
 como una banda difusa a 50 kDa.

40 Los resultados de SDS-PAGE para las muestras después de tres meses de almacenamiento a ambas temperaturas  
 ( $< -65$  °C y 5 °C) fueron comparables con los datos de t=0, como se muestra en la Figura 10 e-f. Además para las  
 muestras de congelación-descongelación, no se observó ninguna diferencia en comparación con el material de  
 partida por análisis de SDS-PAGE (datos no mostrados).

45 La Figura 11 muestra los solapamientos de perfiles de HP-SEC para los lotes de ADC a t=0 y t=3 meses a ambas  
 temperaturas. En condiciones de HP-SEC nativas, el material de ADC (t=0) se eluyó como un pico de moléculas de  
 IgG monoméricas con cantidades menores de moléculas IgG diméricas. No se observó ningún cambio para los  
 HuMab-TF-098 (a, b) y HuMab-TF-011 (c, d) conjugados con MMAE y MMAF tras tres meses de almacenamiento.  
 Sin embargo, el material de ADC de HuMab-TF-111 (e, f) e IgG1-b12 (g, h) mostró una reducción de la recuperación  
 50 (altura de pico) a t=3 meses. Esta recuperación menor ya se observó en las muestras de t=10 días y permaneció  
 constante tras almacenamiento prolongado hasta tres meses.

El porcentaje de moléculas de IgG monoméricas (% de monómeros) se calculó a partir del perfil de pico de HP-SEC  
 y los datos se resumen en la Tabla 9. Para comparación, se muestra el % de monómeros de material no conjugado.  
 55 Los datos muestran que  $> 95$  % del material de ADC consistió en moléculas de IgG monoméricas intactas. El % de  
 monómero permaneció sin cambios después de tres meses de almacenamiento a  $< -65$  °C y 5 °C, lo que indica que  
 no se formó ningún agregado con el tiempo.

60 El análisis por HP-SEC de las muestras de congelación/descongelación mostró que la recuperación de pico IgG de  
 todas las muestras fue similar a recuperaciones a t=0 (datos no mostrados). Sin embargo, la congelación-  
 descongelación del material de HuMab-TF-ADC dio como resultado un % de monómero ligeramente menor (1,5-  
 3,6%), como se muestra en la Tabla 9. Esto se debió a la formación de cantidades menores de agregados  
 (moléculas de IgG diméricas como se valora por HP-SEC, datos no mostrados).

65 Se ensayó la unión de HuMab-TF-098, -011 y -111 no conjugados y conjugados con proteína recombinante del  
 dominio extracelular de FT (TFECDHis) mediante ELISA. Después de tres meses de almacenamiento a  $< -65$  °C y

5 °C, la capacidad de unión no cambió en comparación con la de t=0, como se muestra en la Figura 12. Se obtuvieron resultados similares para las muestras de congelación-descongelación (datos no mostrados).

5 Los experimentos de estabilidad muestran que el material de ADC, a 1 mg/ml, fue estable a < -65 °C y a 5 °C durante al menos tres meses, como se determinó por SDS-PAGE, HP-SEC y unión con TFECDHs. Se indujo formación de agregados menor por congelación-descongelación repetida del material.

**Tabla 9: análisis por HP-SEC de muestras de ADC.**

Los datos mostrados son porcentajes de moléculas monoméricas.

	enlazador-toxina	T=0	t=3 meses		congelación-descongelación (3 viales separados)		
			< -65 °C	5 °C	1	2	3
<b>HuMab-TF-098</b>	no conjugado	> 99	-	-	-	-	-
	vcMMAE	98,3	97,6	98,3	96,8	96,1	96,2
	mcMMAF	95,4	98,2	98,2	92,3	92,0	91,9
<b>HuMab-TF-011</b>	no conjugado	96,1	-	-	-	-	-
	vcMMAE	96,3	95,2	95,6	93,4	93,0	92,9
	mcMMAF	95,8	96,6	96,4	94,2	93,5	93,7
<b>HuMab-TF-111</b>	no conjugado	> 99	-	-	-	-	-
	vcMMAE	98,3	98,3	98,4	96,5	94,6	95,9
	mcMMAF	97,9	97,8	> 99	95,5	95,1	94,8
<b>IgG1-b12</b>	no conjugado	> 99	-	-	-	-	-
	vcMMAE	98,2	96,2	97,3	98,3	98,2	98,3
	mcMMAF	98,6	98,8	98,8	98,1	97,9	98,0

10 **Ejemplo 21**

**Respuesta a dosis de ADC anti FT en tratamiento terapéutico de xenoinjertos tumorales HPAF-II en ratones SCID**

15 La eficacia *in vivo* de ADC anti FT se analizó adicionalmente por tratamiento de tumores de xenoinjerto HPAF-II establecidos SC en ratones SCID con diferentes dosis de ADC anti FT. Los xenoinjertos tumorales HPAF-II se establecieron como se ha descrito anteriormente, seguido de cuatro inyecciones con ADC vcMMAE anti FT en dos dosis diferentes (6 y 20 µg/ratón [IgG1-b12 se añadió a una dosis final de 60 µg de IgG1 por ratón] en 100 µl, IP) o mAb no conjugado de control (IgG1-b12; 60 µg/ratón en 100 µl, IP); comenzando cuando los tamaños tumorales fueron de aproximadamente 100-150 mm<sup>3</sup>: día 10, 13, 17 y 21. El volumen tumoral se determinó al menos dos veces por semana. Se calcularon los volúmenes tumorales (mm<sup>3</sup>) a partir de mediciones de calibrador (PLEXX) como: 0,52 x (longitud) x (anchura)<sup>2</sup>.

25 La **Figura 13** muestra que las dosis de 20 µg de los tres conjugados de vcMMAE fueron eficaces en la inhibición del crecimiento tumoral de tumores HPAF-II establecidos s.c. La dosis de 6 µg de los tres conjugados de vcMMAE fue capaz de retardar ligeramente, pero no inhibir, el crecimiento tumoral.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Genmab A/S

<120> Conjugados farmacológicos de anticuerpos humanos contra factor tisular

<130> P/65.WO

35

<160> 82

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 647 388 T3

<210> 1  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 1

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

10 <210> 2  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 2

Gly Phe Thr Val Ser Asn Asp Gly  
 1 5

20 <210> 3  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 3

Ile Trp Tyr Asp Gly Val Asn Lys  
 1 5

30 <210> 4  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 647 388 T3

<400> 4

Ala Arg Arg Pro Gly Thr Phe Tyr Gly Leu Asp Val  
 1 5 10

5 <210> 5  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 5

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Trp Gly Tyr Tyr Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

15 <210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 6

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala  
 1 5

25 <210> 7  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

ES 2 647 388 T3

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Thr  
1 5

5 <210> 8  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 8

Ala Arg Ser Pro Trp Gly Tyr Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10

10 <210> 9  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
15 <400> 9

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Gly Tyr Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg  
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

20 <210> 10  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
25 <400> 10

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala  
1 5

<210> 11

ES 2 647 388 T3

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 11

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Ser Thr  
 1 5

10 <210> 12  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 12

Ala Lys Asp Gly Tyr Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Asp Leu  
 1 5 10

20 <210> 13  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

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

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

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

Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Ala Pro Trp Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

25 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

30 <210> 14  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

ES 2 647 388 T3

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly  
1 5

5  
<210> 15  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 15

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr  
1 5

10  
  
15  
<210> 16  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 16

Ala Lys Ala Pro Trp Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

20  
  
25  
<210> 17  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 17

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

30  
<210> 18  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

ES 2 647 388 T3

<400> 18

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala  
1 5

5 <210> 19  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 19

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr  
1 5

15 <210> 20  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 20

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

25 <210> 21  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

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

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

30 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Ala Lys Gly Leu Asp Trp Val  
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Val Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

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

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

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile  
100 105 110

Leu Val Ala Val Ser Ser  
115

<210> 22

ES 2 647 388 T3

<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 22

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala  
1 5

10 <210> 23  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 23

Ile Ser Gly Ser Gly Val Thr Thr  
1 5

20 <210> 24  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

25 Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

30 <210> 25  
<211> 120  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

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

ES 2 647 388 T3

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

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

Ala Val Ile Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Asp Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

5 <210> 26  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 26

10 Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Ala  
 1 5

15 <210> 27  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

20 Ile Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Asp  
 1 5

25 <210> 28  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

30 <210> 29  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 647 388 T3

<400> 29

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

5 <210> 30  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 30

Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Ala  
 1 5

15 <210> 31  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 31

Val Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Lys  
 1 5

25 <210> 32  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 32

ES 2 647 388 T3

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

5  
 <210> 33  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 33

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe Asn Asn Tyr  
 20 25 30

Pro Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Gly Gly Asp Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Met Val Ser Val Ser Ser  
 115

10  
 <210> 34  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 34

Gly Gly Ser Phe Asn Asn Tyr Pro  
 1 5

20  
 <210> 35  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 35

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Thr  
 1 5

ES 2 647 388 T3

5 <210> 36  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 36

Ala Gly Gly Asp Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile  
 1 5 10

10 <210> 37  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 15 <400> 37

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

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

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp His Thr Met Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

20 <210> 38  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 25 <400> 38

Gly Phe Thr Phe Asn Arg Tyr Ala  
 1 5

30 <210> 39  
 <211> 8  
 <212> PRT

ES 2 647 388 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 39

5                   Ile Ser Asn Asp Gly Ile Asn Lys  
                    1                   5

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

15                   Ala Arg Asp His Thr Met Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr  
                    1                   5                   10

<210> 41

<211> 107

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser  
                    20                   25                   30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
                    35                   40                   45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50                   55                   60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
65                   70                   75                   80

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

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

25 <210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 42

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr  
1                   5

<210> 43

35 <211> 3

ES 2 647 388 T3

<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 43

5

Gly Ala Ser  
1

<210> 44  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 44

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr  
1 5

15

<210> 45  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 45

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

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

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

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

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

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

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

25

<210> 46  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 46

Gln Gly Ile Ser Ser Arg  
1 5

ES 2 647 388 T3

<210> 47  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 47

Ala Ala Ser  
 1

10 <210> 48  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 48

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5

20 <210> 49  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 49

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser  
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu  
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

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

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

30 <210> 50  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 50

ES 2 647 388 T3

Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr  
 1 5

5 <210> 51  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 51

Gly Ala Ser  
 1

10 <210> 52  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 52

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr  
 1 5

20 <210> 53  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 25 <213> *Homo sapiens*

<400> 53

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Ser  
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu  
 65 70 75 80

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

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

30 <210> 54  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 647 388 T3

<400> 54

Gln Ser Val Gly Ser Ser Ser  
1 5

5 <210> 55  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 55

Gly Ala Ser  
1

15 <210> 56  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 56

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr  
1 5

25 <210> 57  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 57

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

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

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

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

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

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

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

30 <210> 58  
<211> 6  
<212> PRT

ES 2 647 388 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 58

Gln Gly Ile Ser Ser Arg  
1 5

5

<210> 59

<211> 3

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 59

Ala Ala Ser  
1

15

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 60

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr  
1 5

25

<210> 61

<211> 108

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 61

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

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

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

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

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

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

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

<210> 62

ES 2 647 388 T3

<211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 62

Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 1 5

10 <210> 63  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 63

Ala Ala Ser  
 1

20 <210> 64  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 64

25 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Tyr Thr  
 1 5 10

30 <210> 65  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 65

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu  
 85 90 95

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

35

ES 2 647 388 T3

5 <210> 66  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 66

Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 1 5

10 <210> 67  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 15 <400> 67

Asp Ala Ser  
 1

20 <210> 68  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 68

25 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr  
 1 5

30 <210> 69  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 69

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

Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu  
 85 90 95

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

35

ES 2 647 388 T3

5 <210> 70  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 70

Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 1 5

10 <210> 71  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 15 <400> 71

Asp Ala Ser  
 1

20 <210> 72  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 25 <400> 72

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr  
 1 5

30 <210> 73  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 73

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

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

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

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

35 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro



ES 2 647 388 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu  
 85 90 95

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

5 <210> 78  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 78

10 Gln Ser Val Ser Ser Tyr  
 1 5

15 <210> 79  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 79

20 Asp Ala Ser  
 1

<210> 80  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 80

25 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr  
 1 5

30 <210> 81  
 <211> 327  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 647 388 T3

<400> 81

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

ES 2 647 388 T3

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
290 295 300

ES 2 647 388 T3

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
325

5 <210> 82  
<211> 315  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 82

ES 2 647 388 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Arg Val Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro  
 100 105 110

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr  
 115 120 125

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn  
 130 135 140

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg  
 145 150 155 160

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val  
 165 170 175

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser  
 180 185 190

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys  
 195 200 205

ES 2 647 388 T3

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu  
 210 215 220

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe  
 225 230 235 240

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu  
 245 250 255

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe  
 260 265 270

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly  
 275 280 285

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr  
 290 295 300

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 305 310 315

## REIVINDICACIONES

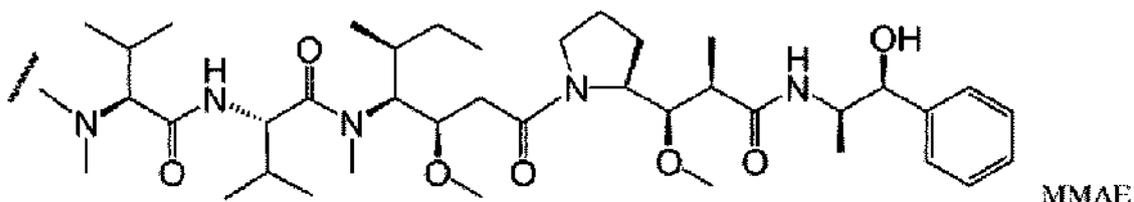
1. Un conjugado farmacológico de anticuerpo que comprende un anticuerpo que se une con un factor tisular, donde el anticuerpo se ha conjugado con una auristatina o un análogo peptídico funcional o derivado del mismo mediante un enlazador, y donde el anticuerpo del conjugado comprende una región VH que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 7 y una región CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8, y una región VL que comprende una región CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 46, una región CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 47 y una región CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 48.

2. El conjugado farmacológico de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo comprende una región VH que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región VL que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.

3. El conjugado farmacológico de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa.

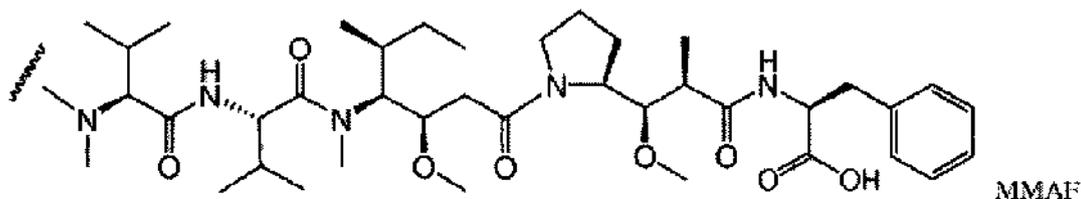
4. El conjugado farmacológico de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 monoclonal completamente humano, tal como un IgG1,K.

5. El conjugado farmacológico de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la auristatina es monometil auristatina E (MMAE):



donde la línea ondulada indica el sitio de unión para el enlazador.

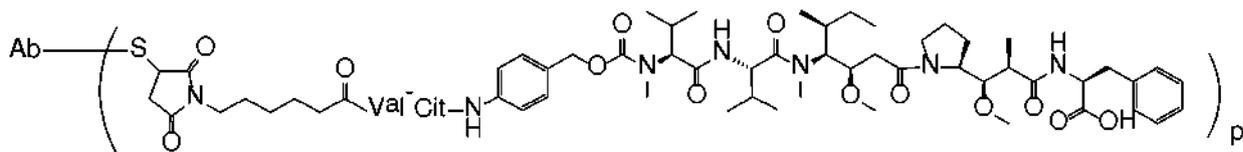
6. El conjugado farmacológico de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la auristatina es monometil auristatina F (MMAF):



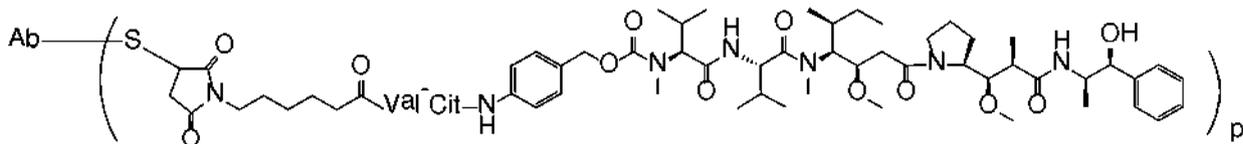
donde la línea ondulada indica el sitio de unión para el enlazador.

7. El conjugado farmacológico de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el enlazador está unido a restos de sulfhidrilo del anticuerpo anti FT obtenido por reducción (parcial) del anticuerpo anti FT.

8. El conjugado farmacológico de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o 7, donde el enlazador-auristatina es vcMMAF o vcMMAE:



Ab-MC-vc-PAB-MMAF (vcMMAF)

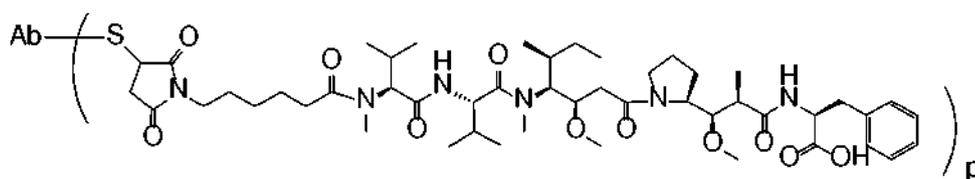


Ab-MC-vc-PAB-MMAE (vcMMAE)

donde p indica un número de 1 a 8, S representa un resto de sulfhidriilo del anticuerpo anti FT y Ab designa el anticuerpo anti FT.

5 9. El conjugado farmacológico de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 8, donde el enlazador-auristatina es vcMMAE como se ha definido en la reivindicación 8.

10 10. El conjugado farmacológico de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o 6-7, donde el enlazador-conjugado es mcMMAF:



Ab-MC-MMAF (mcMMAF)

15 donde p indica un número de 1 a 8, S representa un resto de sulfhidriilo del anticuerpo anti FT y Ab designa el anticuerpo anti FT.

11. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado farmacológico de anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 12. El conjugado farmacológico de anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso como un medicamento.

25 13. El conjugado farmacológico de anticuerpo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en el tratamiento del cáncer.

30 14. El conjugado farmacológico de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en tumores del sistema nervioso central, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, tal como NSCLC, cáncer de mama, específicamente cáncer de mama triple negativo, cáncer esofágico, cáncer gástrico o de estómago, cáncer de hígado y biliar, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer endometrial, cáncer ovárico, melanoma maligno, sarcoma, tumores de origen primario desconocido, cáncer de médula ósea, leucemia linfoblástica aguda, AML, leucemia linfoblástica crónica y linfoma no de Hodgkin, cáncer de piel, glioma, cáncer del cerebro, útero y recto.

35 15. El conjugado farmacológico de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en el tratamiento de cáncer en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como un agente quimioterapéutico.

40 16. Uso del conjugado farmacológico de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

17. El uso de la reivindicación 16, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer seleccionado del grupo que consiste en tumores del sistema nervioso central, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, tal como NSCLC, cáncer de mama, específicamente cáncer de mama triple negativo, cáncer esofágico,

cáncer gástrico o de estómago, cáncer de hígado y biliar, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer endometrial, cáncer ovárico, melanoma maligno, sarcoma, tumores de origen primario desconocido, cáncer de médula ósea, leucemia linfoblástica aguda, AML, leucemia linfoblástica crónica y linfoma no de Hodgkin, cáncer de piel, glioma, cáncer del cerebro, útero y recto.

5

**Figura 1**

VH:

```

|--CDR1--|                |--CDR2--|                |-----CDR3-----|
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLVASTGFVTSNDGMHWVRQAPGKGLEWVALIWYDGVNKNYADSVKGRFTISRDKSKNTDLYLQMNSLRAEDTAVVYCARRPET-----FYGLDYWGQGTTVTVSS  VH1015-114  (1)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVTSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGDYTYYTDSVKGRFTISRDNSKNTDLYLQMNSLRAEDTAVVYCARSPWG-----YYLDSWGQGTLVTVSS  VH1015-011  (5)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVTSNYAMSWVRQAPGKGLEWVAISGSGDSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTDLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGYFL-----LWYFDLWGRGTLTVSS  VH1015-017  (9)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVTSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSVISGSGDTFYADSVKGRFTISRDNSKNTDLYLQMNSLRAEDTAVVYCAKAPWT-----YTFDYWGQGTLVTVSS  VH1015-042  (13)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVFNYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGTYYADSVKGRFTISRDNSKNTDLYLQMNSLRAEDTAVVYCAKTPWG-----YTFDYWGQGTLVTVSS  VH1015-092  (17)
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVTSNYAMSWVRQAPAKGLDMVSGISGSGVTTYYADSVKGRFTISRDNSKNTDLYLQMNSLRAEDTAVVYFCAKTPWG-----YTFDYWGQGTLVAVSS  VH1015-101  (21)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFVTSRYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISNDGYNDYYADSVKGRFTVSRDNSKNTDLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGQLG-----RGYFDYWGQGTLVTVSS  VH1015-025  (25)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCPASGFVTSIYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISNDGYNDYYADSVKGRFTISRDNSKNTDLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDGQLG-----RGYFDYWGQGTLVTVSS  VH1015-109  (29)
QVQLVQSGAEVRRKPGSSVKYSCRASGGSFAMYPIFWVRQAPGQGFEMWGRIIPLIGLTAVAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELNSLRSEDTAVVYCAGAGDD-----LD-----AFDIWQGTMVSVSS  VH1015-098  (33)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFVFNYAMSWVRQAPGKGLDWAVIISNDGINKYADSVKGRFTISRDNSKNTDLYLQMNSLRAEDTAVVYCARDRTWV-----RGAFDYWGQGTLVTVSS  VH1015-111  (37)

```

**Figura 1 continuación...**

VL: | -CDR1 - - | | CDR2 | | - - -CDR3 - - - - |

EIVLTQSPGTL<sup>S</sup>LS<sup>L</sup>SPGERATL<sup>S</sup>CRAS<sup>QSVSS</sup>YLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVC<sup>QVGS</sup>S - - **LT**FGG<sup>T</sup>KV<sup>E</sup>IK VL1015-114 (41)

DIQMTQSP<sup>S</sup>LSASAGDRVTITCRAS<sup>QGISS</sup>-RLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<sup>QVNS</sup>Y<sup>P</sup>-**YT**FGG<sup>T</sup>KL<sup>E</sup>IK VL1015-011 (45)

EIVLTQSPGTL<sup>S</sup>LS<sup>L</sup>SPGERATL<sup>S</sup>CRAS<sup>QSVRS</sup>YLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVC<sup>QVGS</sup>SP - **RT**FGG<sup>T</sup>KV<sup>E</sup>IK VL1015-017 (49)

EIVLTQSPGTL<sup>S</sup>LS<sup>L</sup>SPGERATL<sup>S</sup>CRAS<sup>QSVGS</sup>SLAWYQQKPGQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYVC<sup>QVGS</sup>SP - **RT**FGG<sup>T</sup>KV<sup>E</sup>IK VL1015-042 (53)

DIQMTQSP<sup>S</sup>LSASVGD<sup>R</sup>V<sup>T</sup>ITCRAS<sup>QGISS</sup>-RLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<sup>QVNS</sup>Y<sup>P</sup>-**YT**FGG<sup>T</sup>KL<sup>E</sup>IK VL1015-092 (57)

DIQMTQSP<sup>S</sup>LSASVGD<sup>R</sup>V<sup>T</sup>ITCRAS<sup>QGISS</sup>-MLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<sup>QVNS</sup>Y<sup>P</sup>L**Y**TFGG<sup>T</sup>KL<sup>E</sup>IK VL1015-101 (61)

EIVLTQSPATL<sup>S</sup>SPGERATL<sup>S</sup>CRAS<sup>QSVSS</sup>-YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYVC<sup>QQRSN</sup>W<sup>P</sup>-**LT**FGG<sup>T</sup>KV<sup>E</sup>IK VL1015-025 (65)

EIVLTQSPATL<sup>S</sup>SPGERAIL<sup>S</sup>CRAS<sup>QSVSS</sup>-YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYVC<sup>QQRSN</sup>W<sup>P</sup>-**LT**FGG<sup>T</sup>KV<sup>E</sup>IK VL1015-109 (69)

DIQMTQSP<sup>S</sup>LSASVGD<sup>R</sup>V<sup>T</sup>ITCRAS<sup>QGISS</sup>-MLAWYQQKPEKAPKSLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC<sup>QVNS</sup>Y<sup>P</sup>-**YT**FGG<sup>T</sup>KL<sup>E</sup>IK VL1015-098 (73)

EIVLTQSPATL<sup>S</sup>SPGERATL<sup>S</sup>CRAS<sup>QSVSS</sup>-YLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYVC<sup>QQRSN</sup>W<sup>P</sup>-**LT**FGG<sup>T</sup>KV<sup>E</sup>IK VL1015-111 (77)

**Figura 2**

**SEQ ID NO: 81:**

1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
 51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV**ES**  
 101 **KYGPPCPSCP APEFLGGPSV** FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED  
 151 PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK  
 201 CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPOVYT LPPSQEEMTK NOVSLTCLVK  
 251 GFYPSDIAVE WESNGOPENN YKTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG  
 301 NVFSCVMHE ALHNHYTOKS LSLSLGK

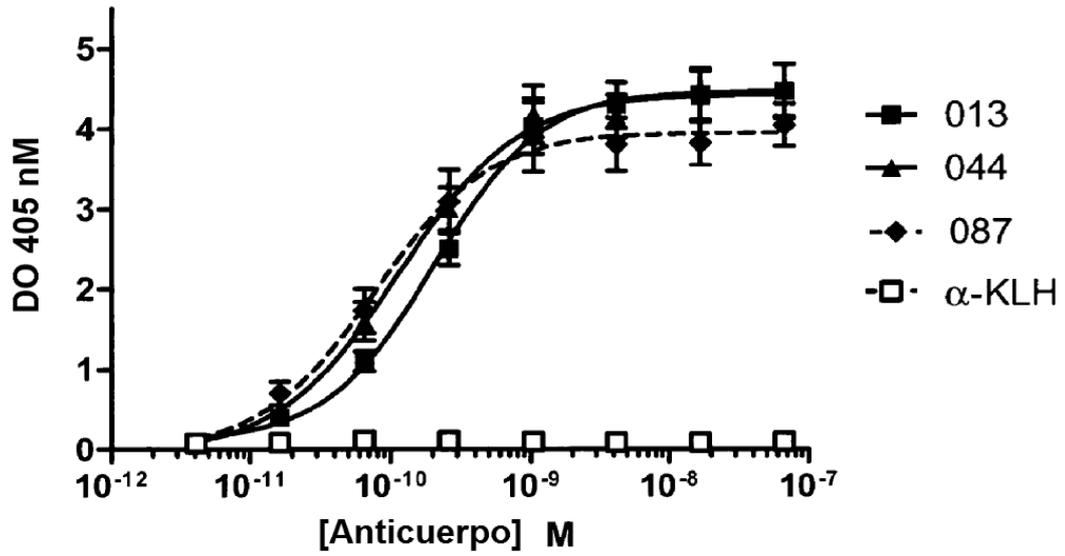
**SEQ ID NO: 82:**

1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
 51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVAP  
 101 EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV  
 151 EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI  
 201 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE  
 251 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL  
 301 HNHYTQKSLS LSLGK

**Figura 3**

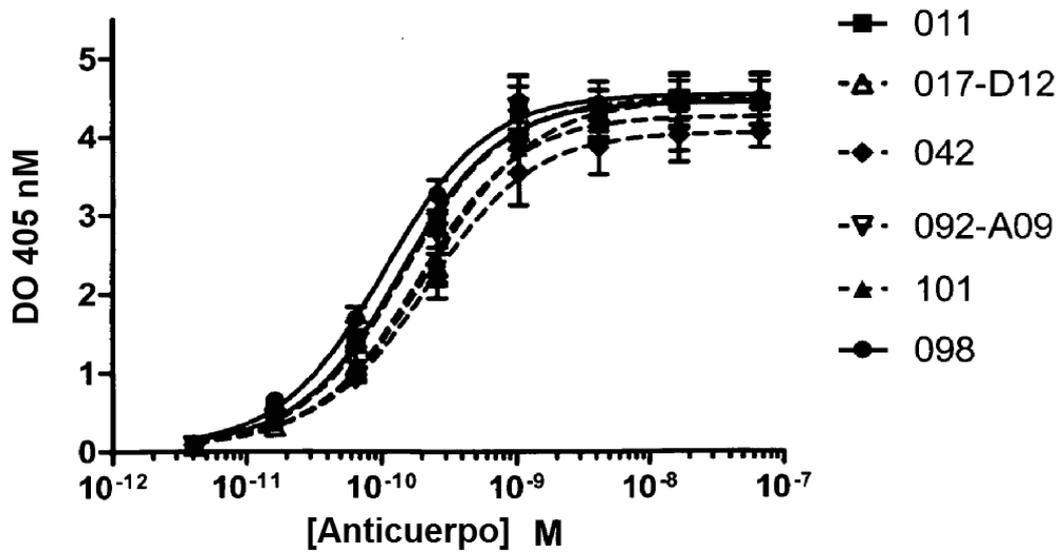
### ELISA TFECDhis

Grupo de bloqueo cruzado I



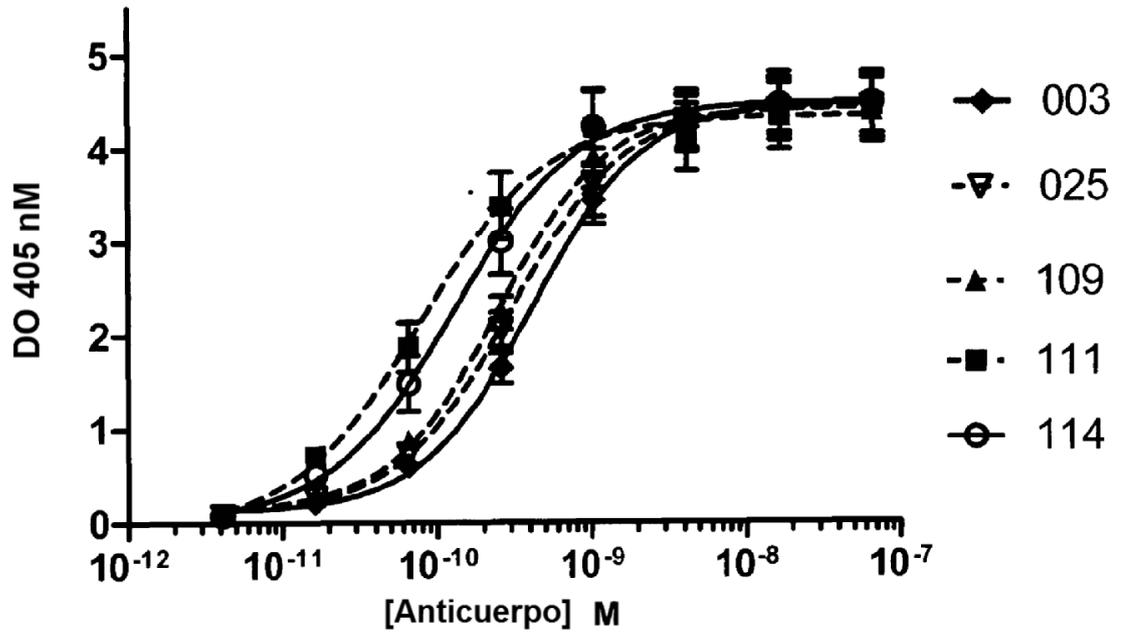
### ELISA TFECDhis

Bloqueo cruzado II



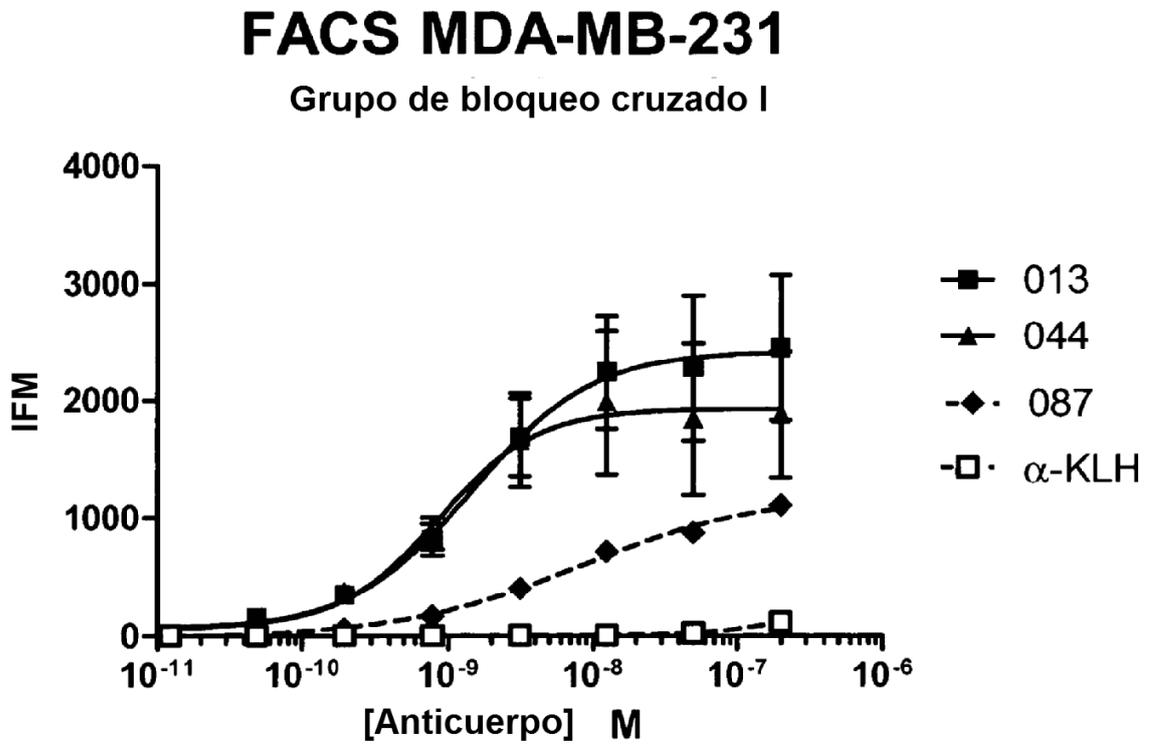
**Figura 3 continuación...**

**ELISA TFECDhis**  
 Bloqueo cruzado III (II/III)



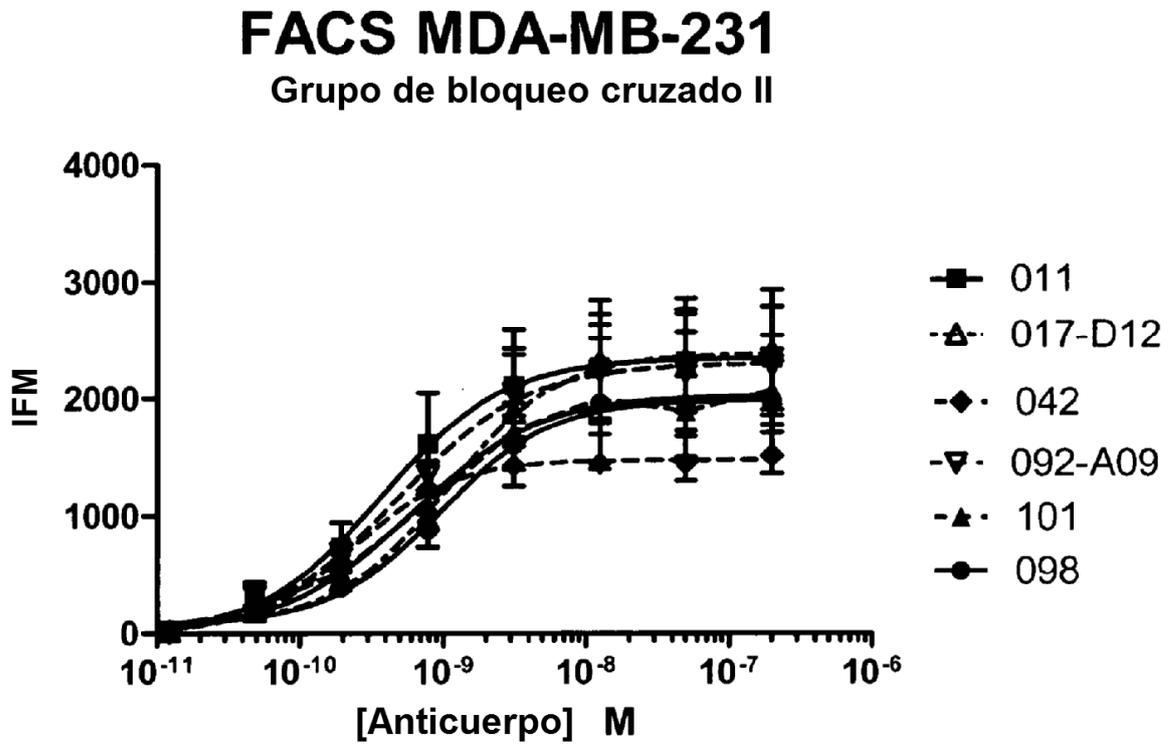
**Figura 4**

a)



**Figura 4 continuación...**

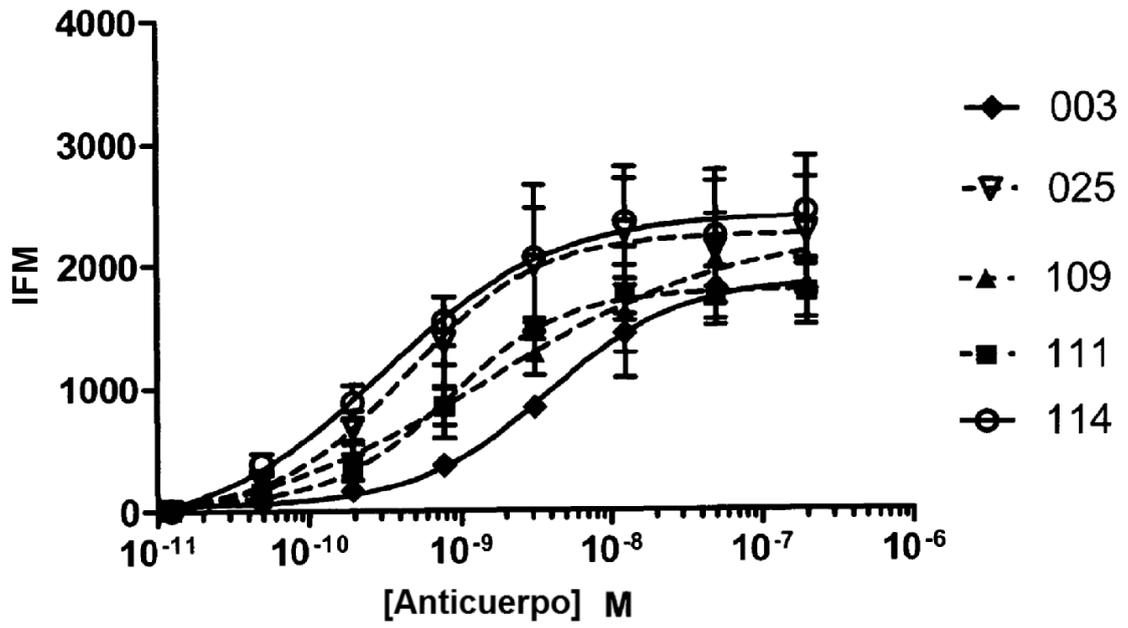
b)



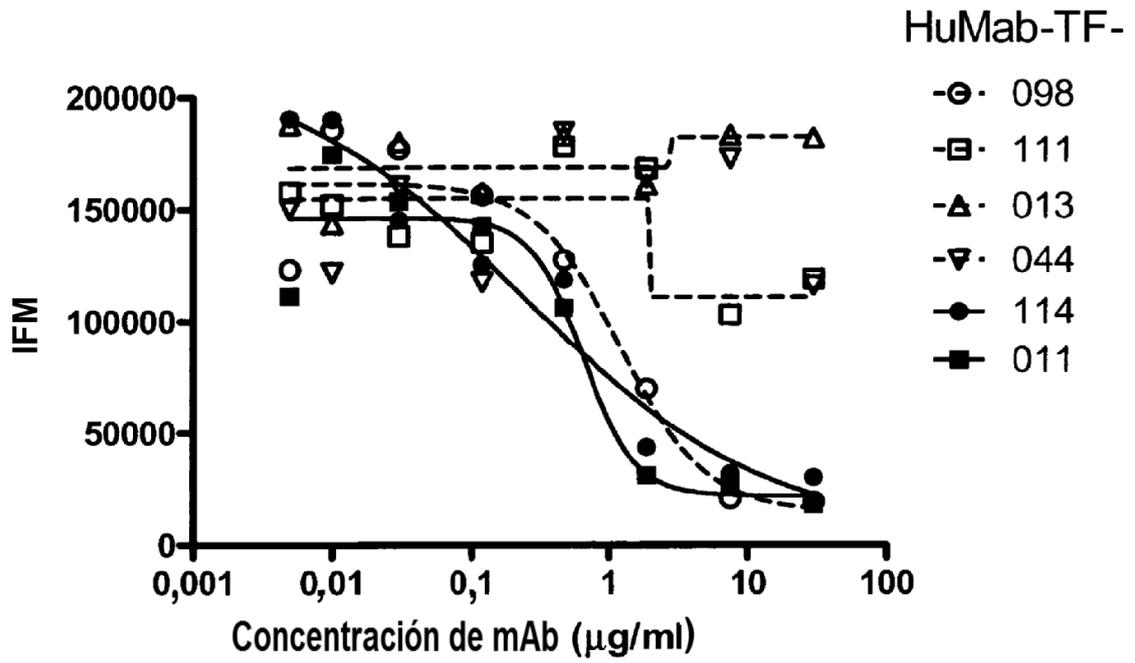
**Figura 4 continuación...**

c)

**FACS MDA-MB-231**  
Bloqueo cruzado III (II/III)

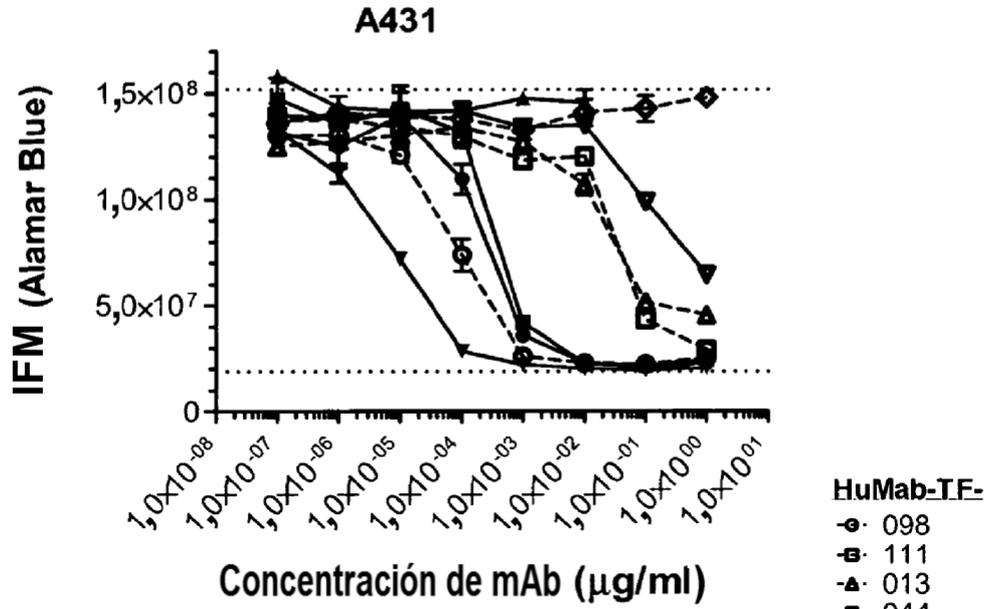


**Figura 5**

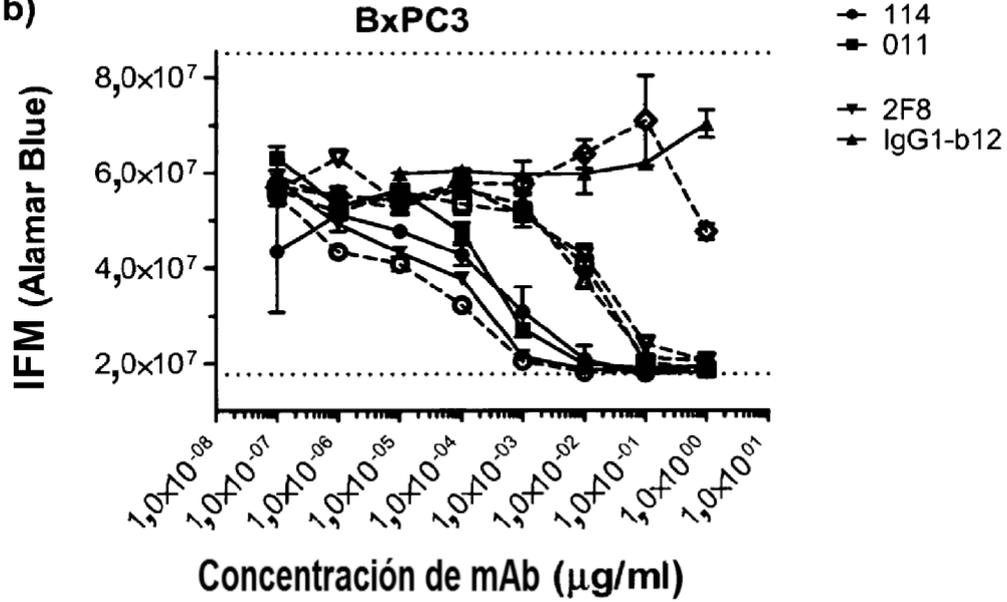


**Figura 6**

a)

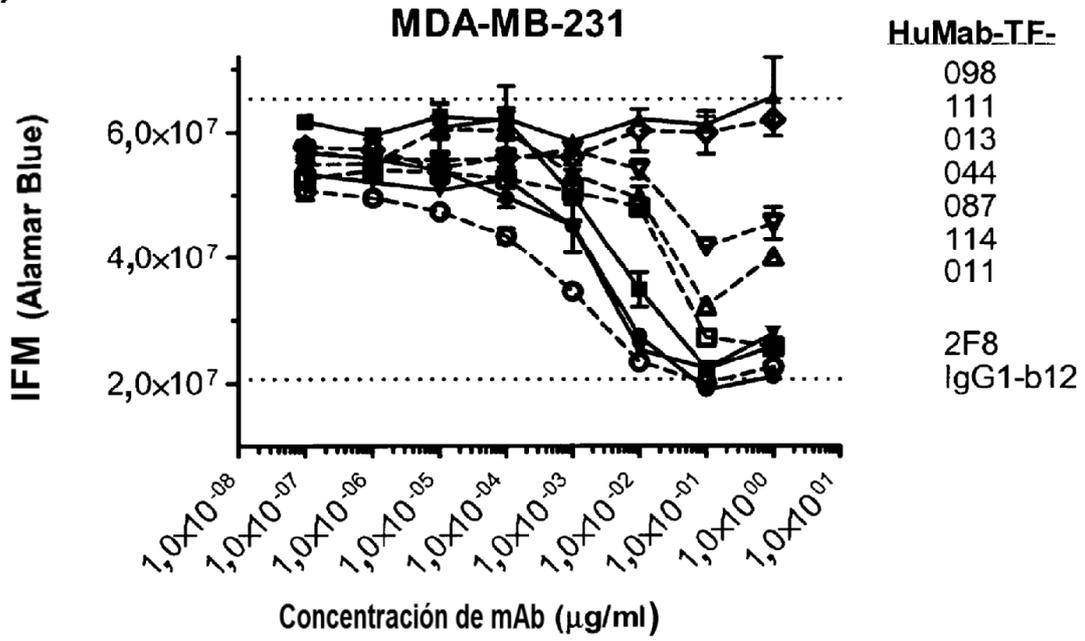


b)



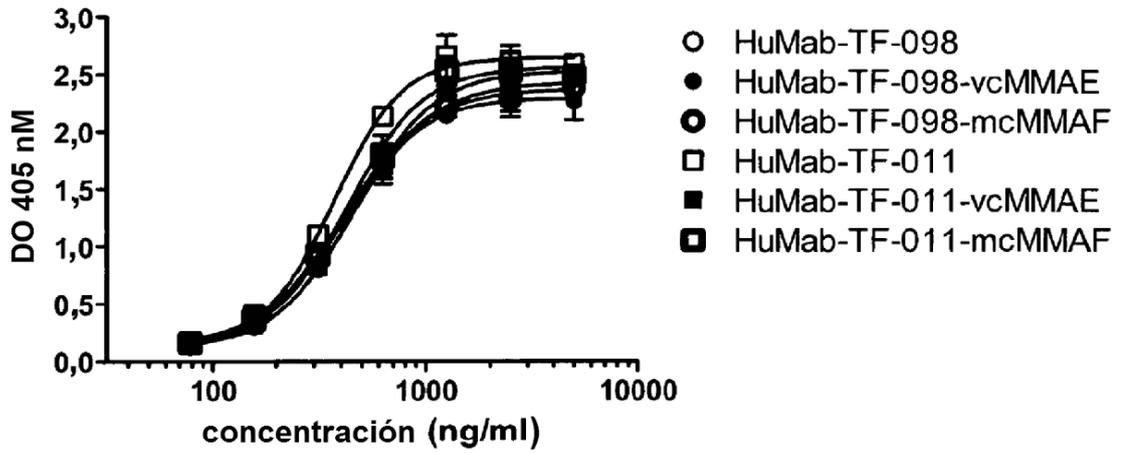
**Figura 6 continuación...**

c)

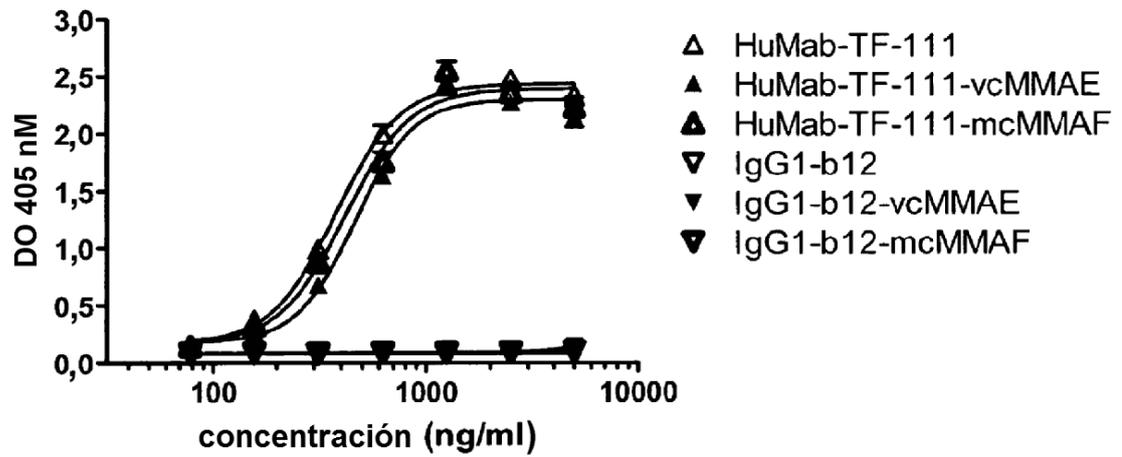


**Figura 7**

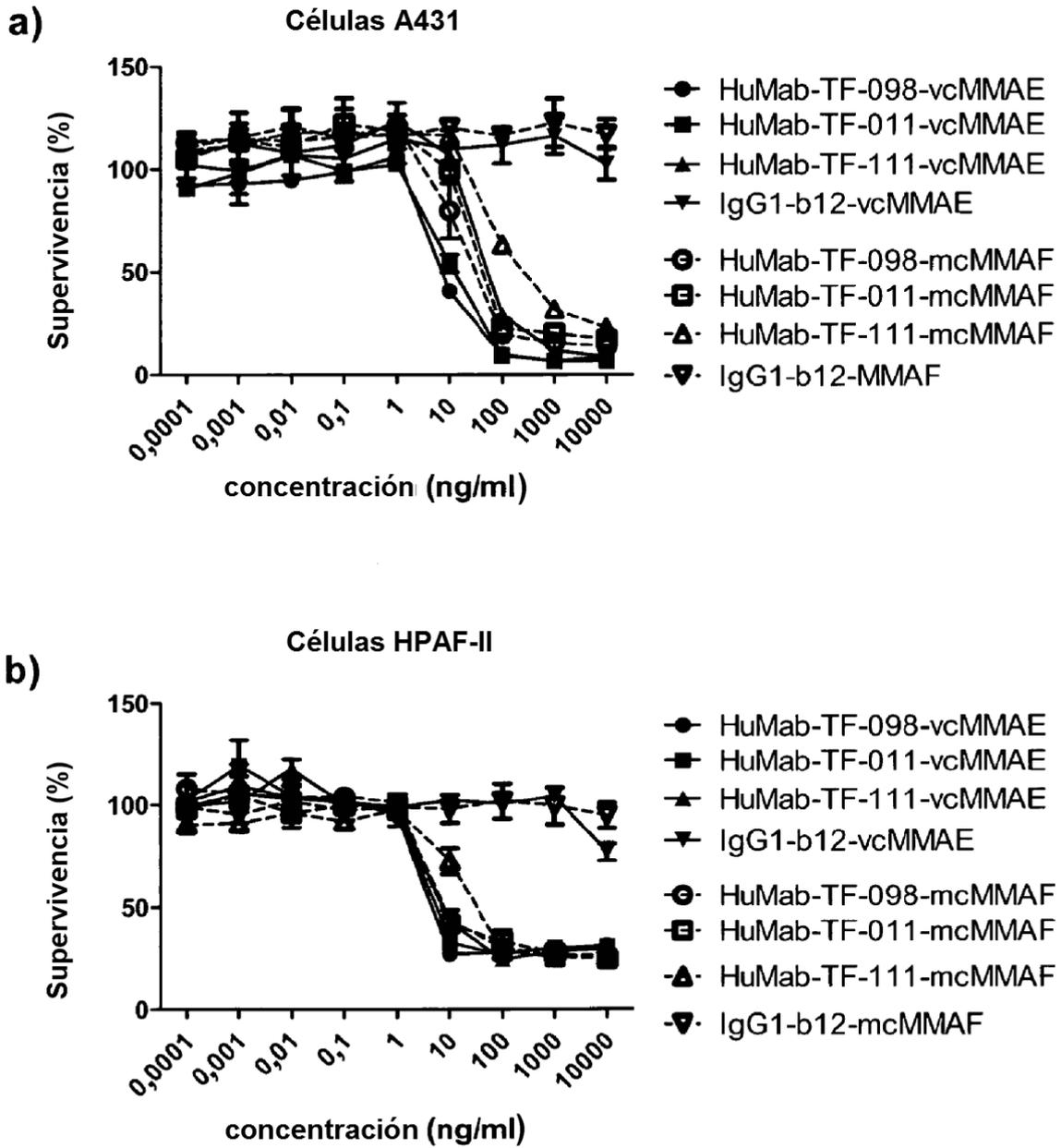
a)



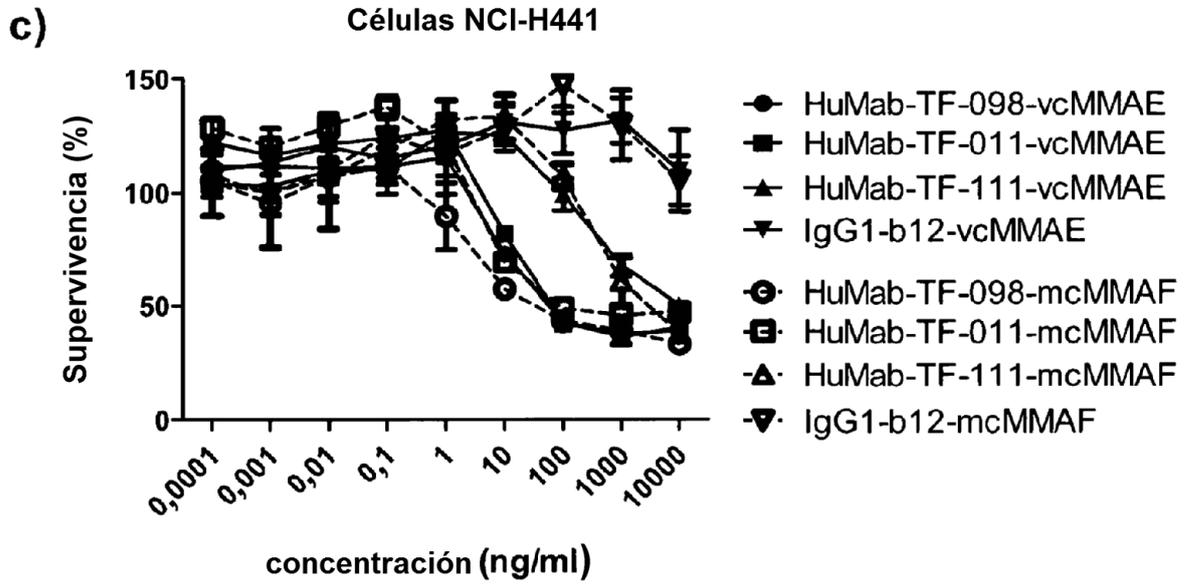
b)



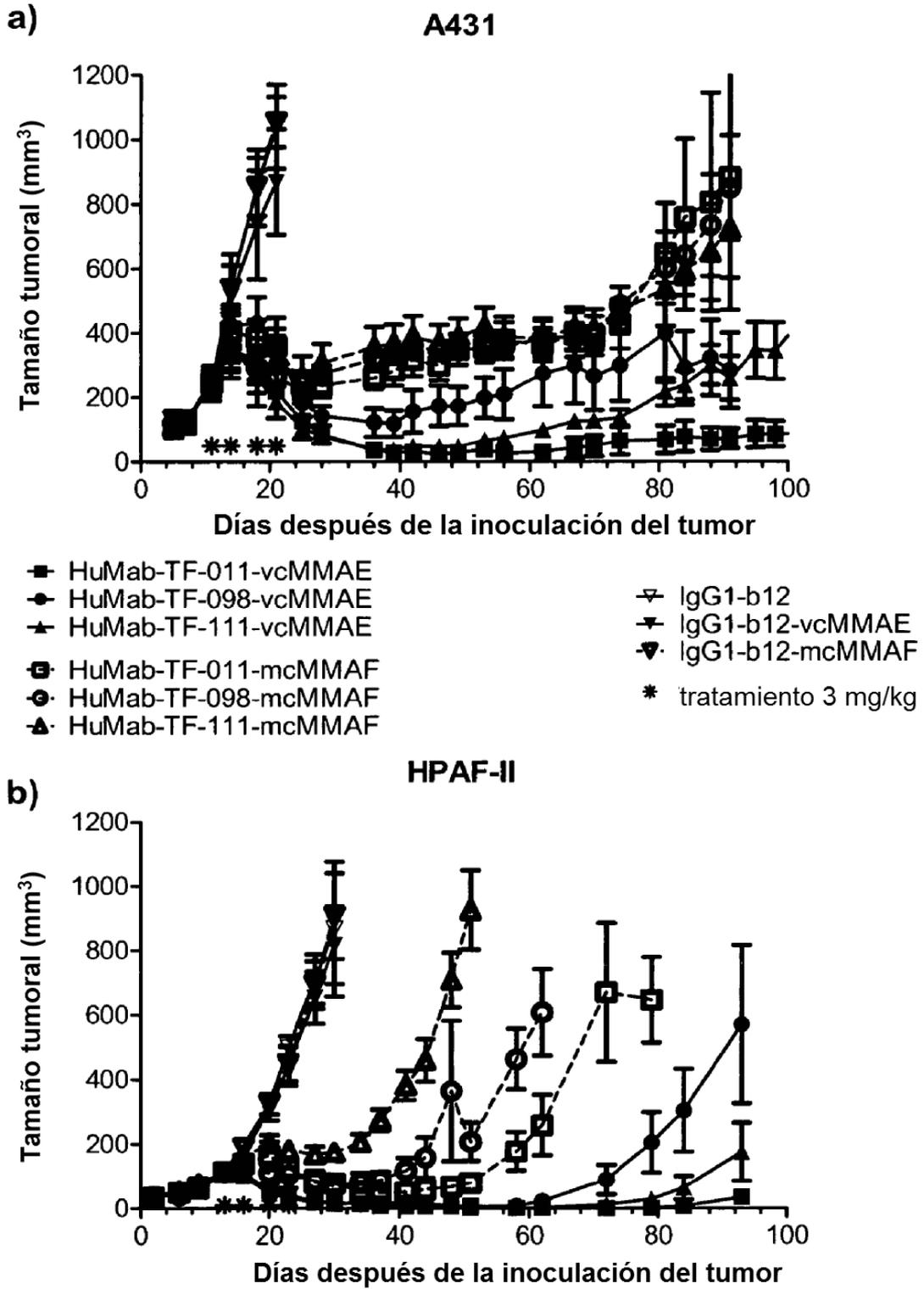
**Figura 8**



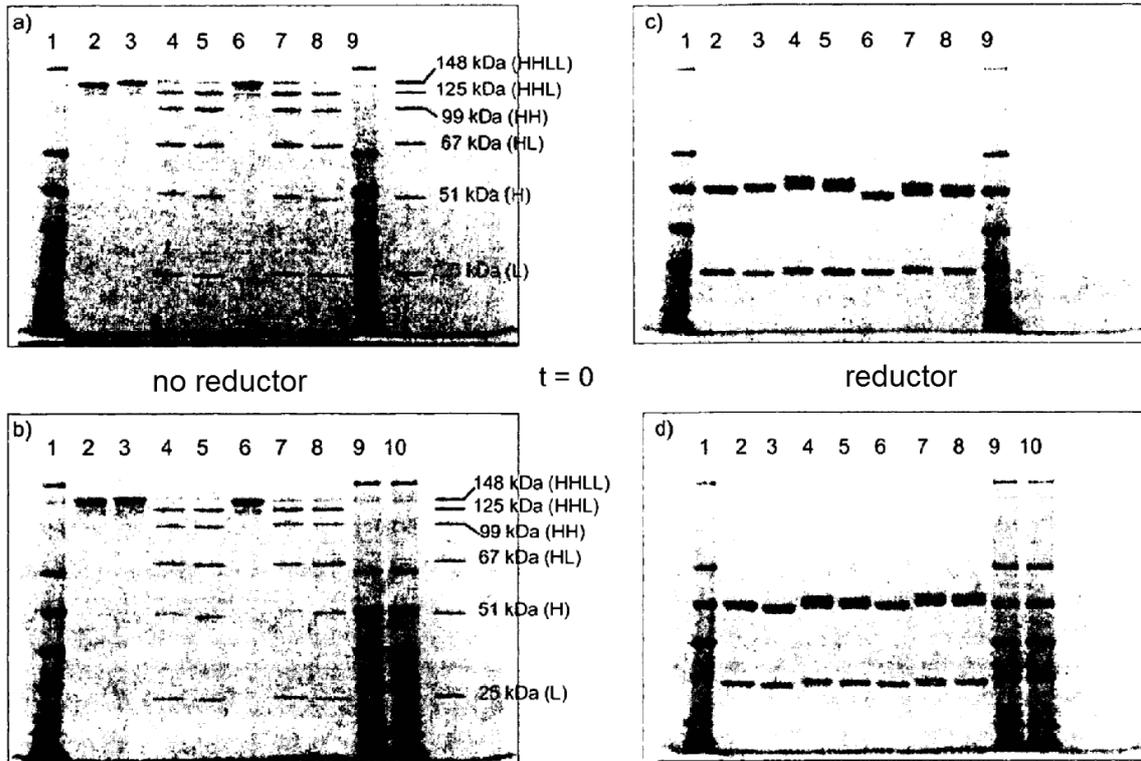
**Figura 8 continuación...**



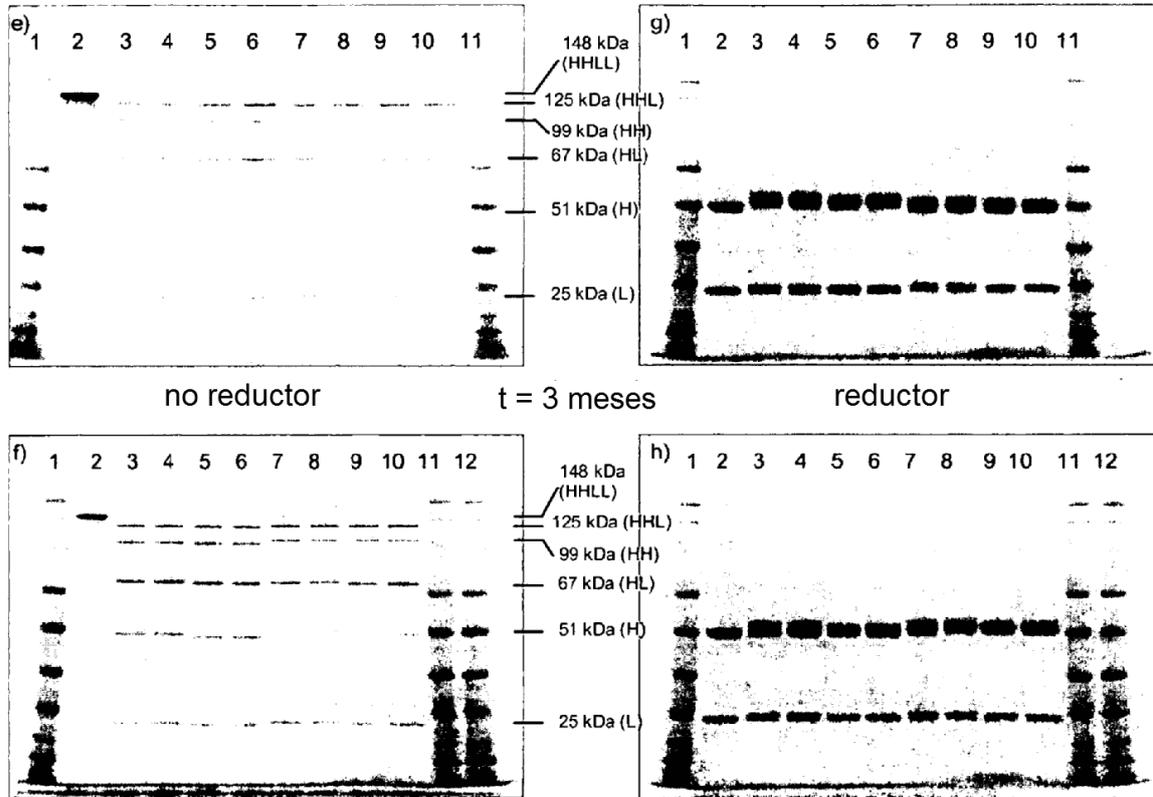
**Figura 9**



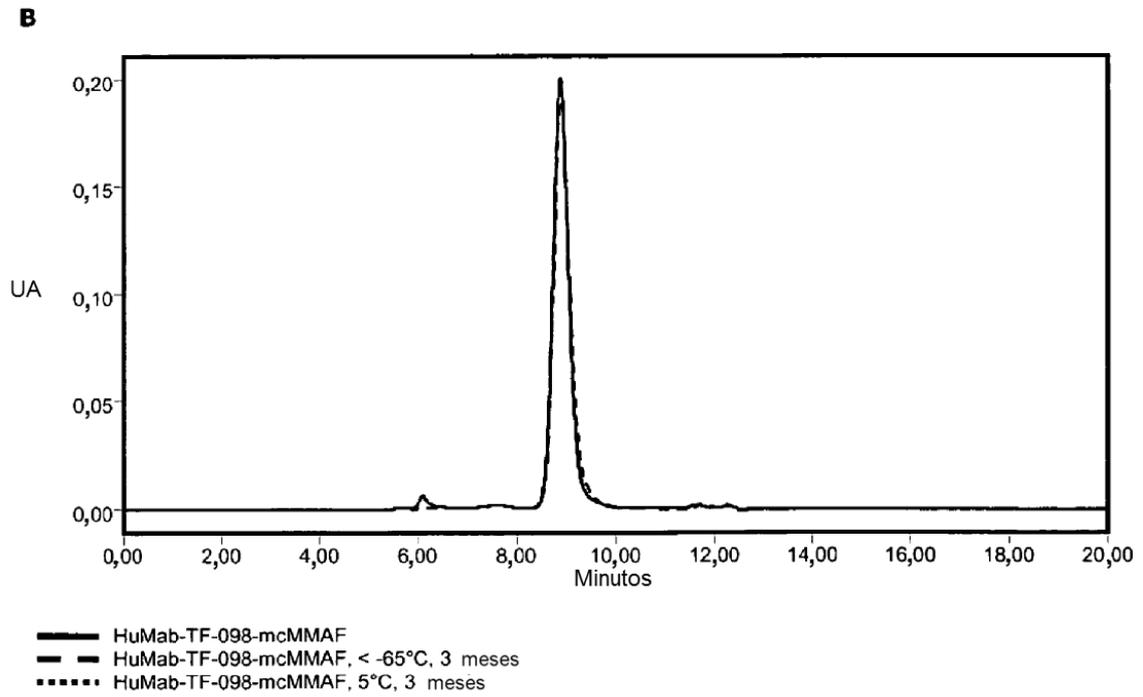
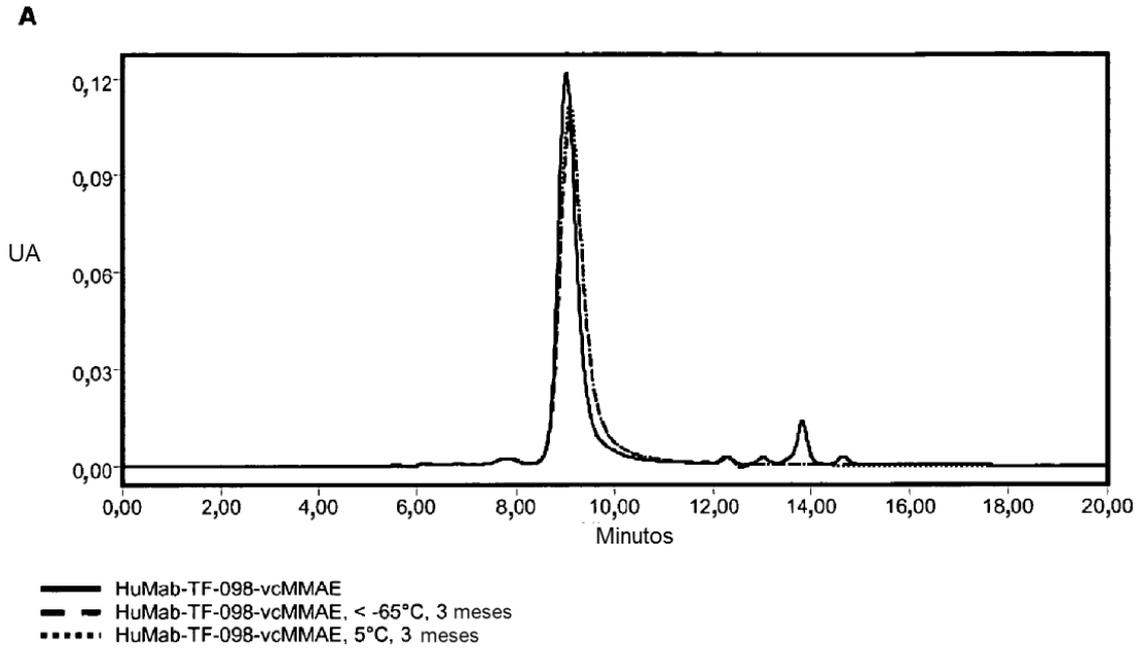
**Figura 10**



**Figura 10 continuación...**

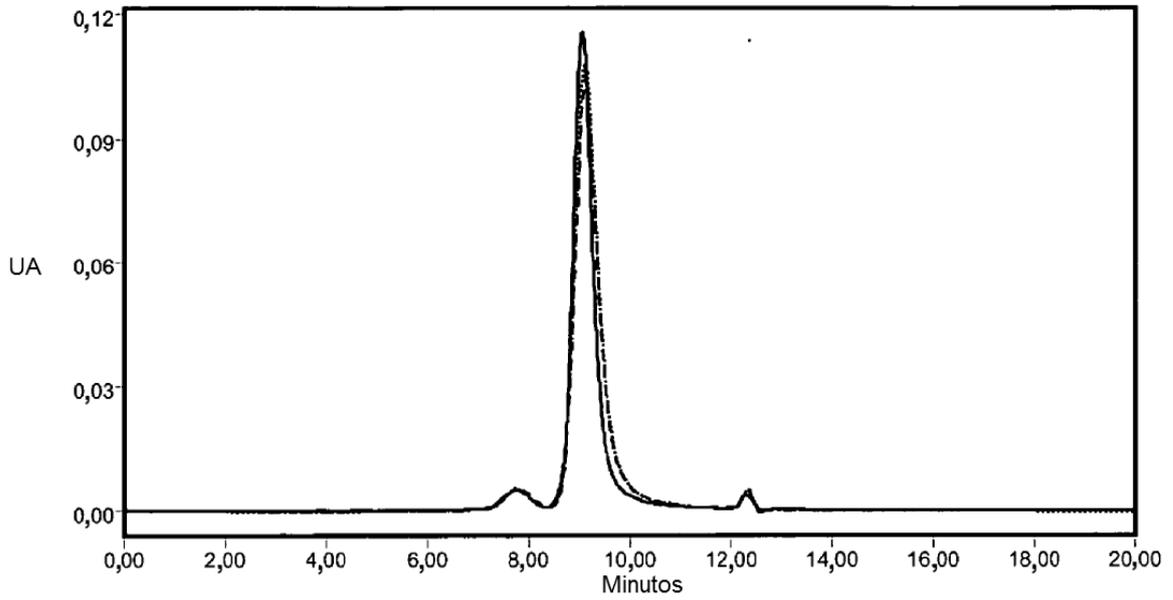


**Figura 11**



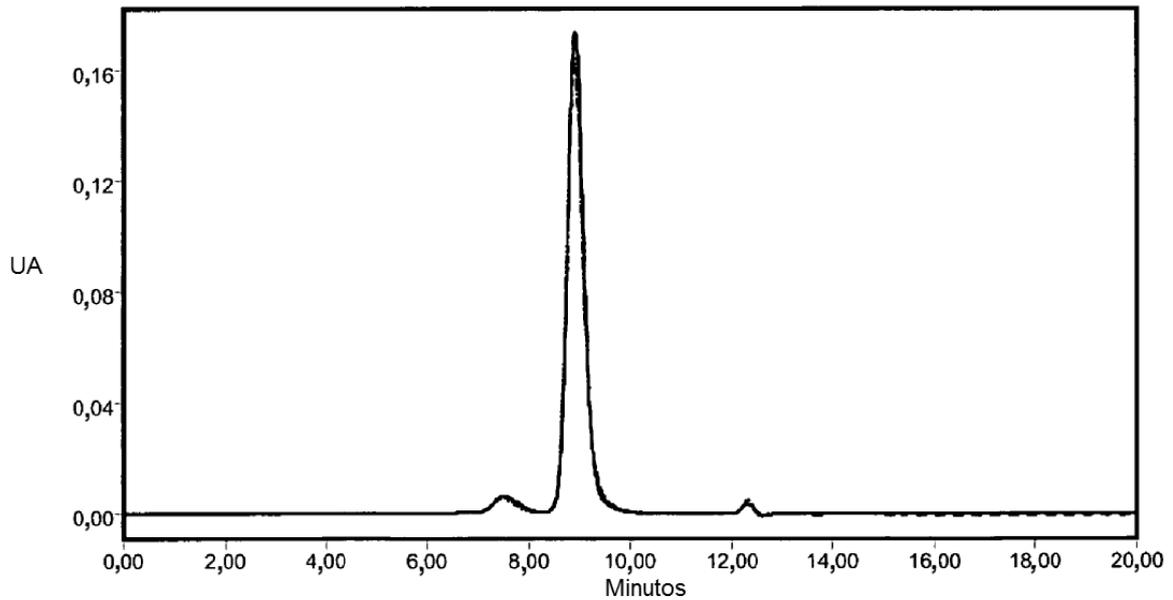
**Figura 11 continuación...**

**C**



— HuMab-TF-011-vcMMAE  
 - - HuMab-TF-011-vcMMAE, < -65°C, 3 meses  
 ..... HuMab-TF-011-vcMMAE, 5°C, 3 meses

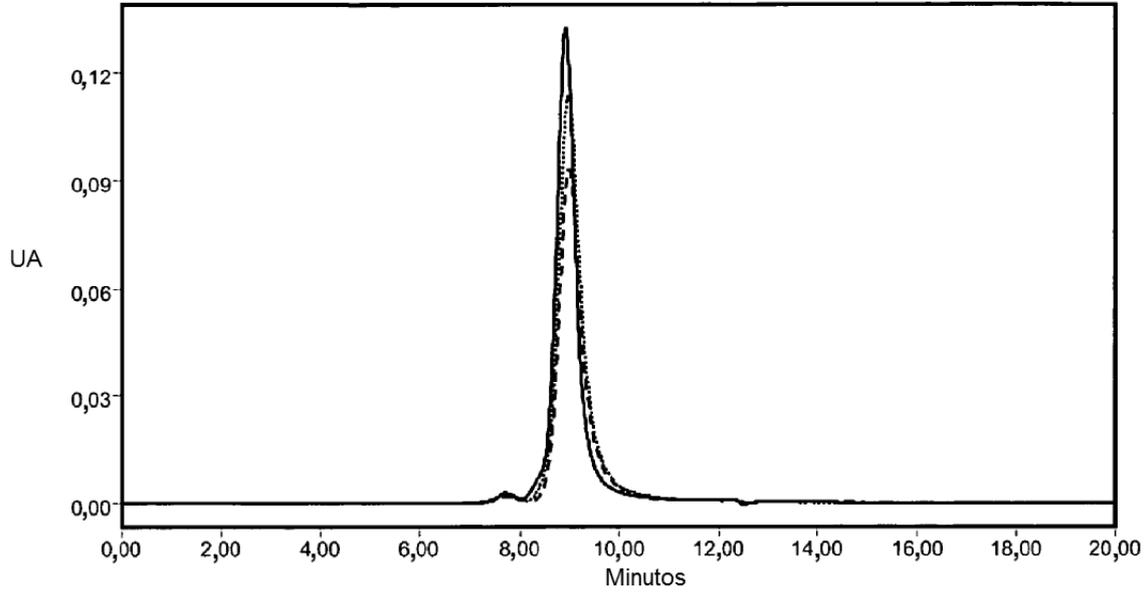
**D**



— HuMab-TF-011-mcMMAF  
 - - HuMab-TF-011-mcMMAF, < -65°C, 3 meses  
 ..... HuMab-TF-011-mcMMAF, 5°C, 3 meses

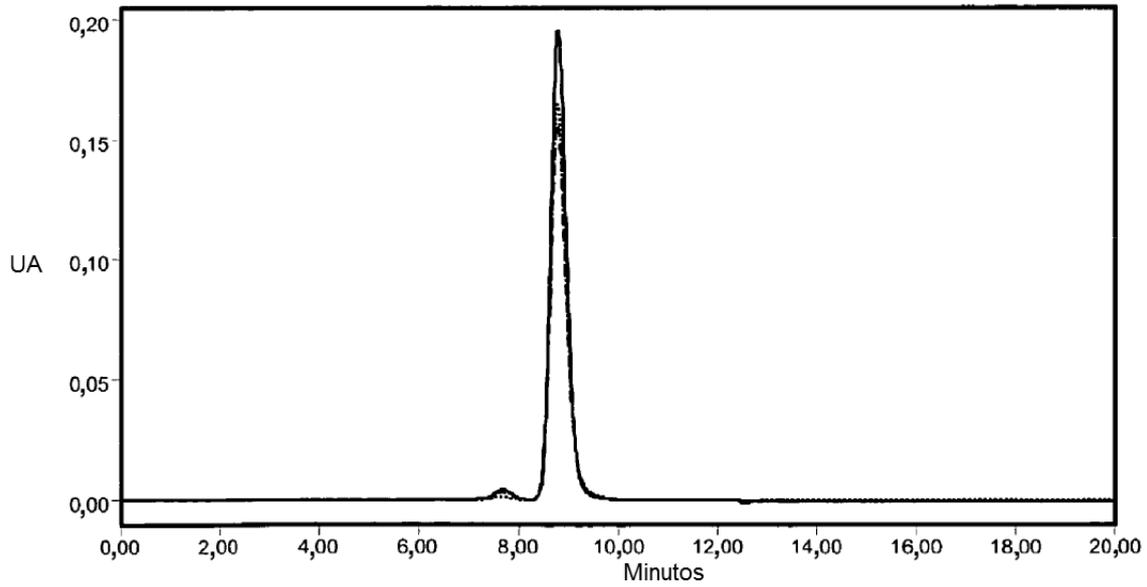
**Figura 11 continuación...**

**E**



— HuMab-TF-111-vcMMAE  
 - - HuMab-TF-111-vcMMAE, < -65°C, 3 meses  
 ..... HuMab-TF-111-vcMMAE, 5°C, 3 meses

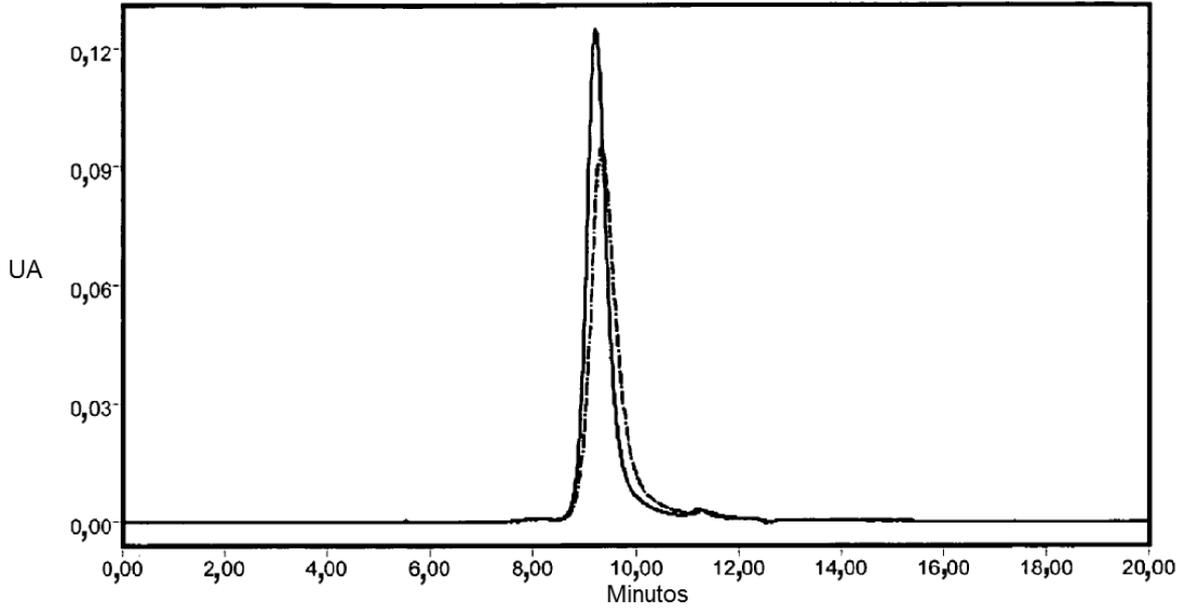
**F**



— HuMab-TF-111-mcMMAF  
 - - HuMab-TF-111-mcMMAF, < -65°C, 3 meses  
 ..... HuMab-TF-111-mcMMAF, 5°C, 3 meses

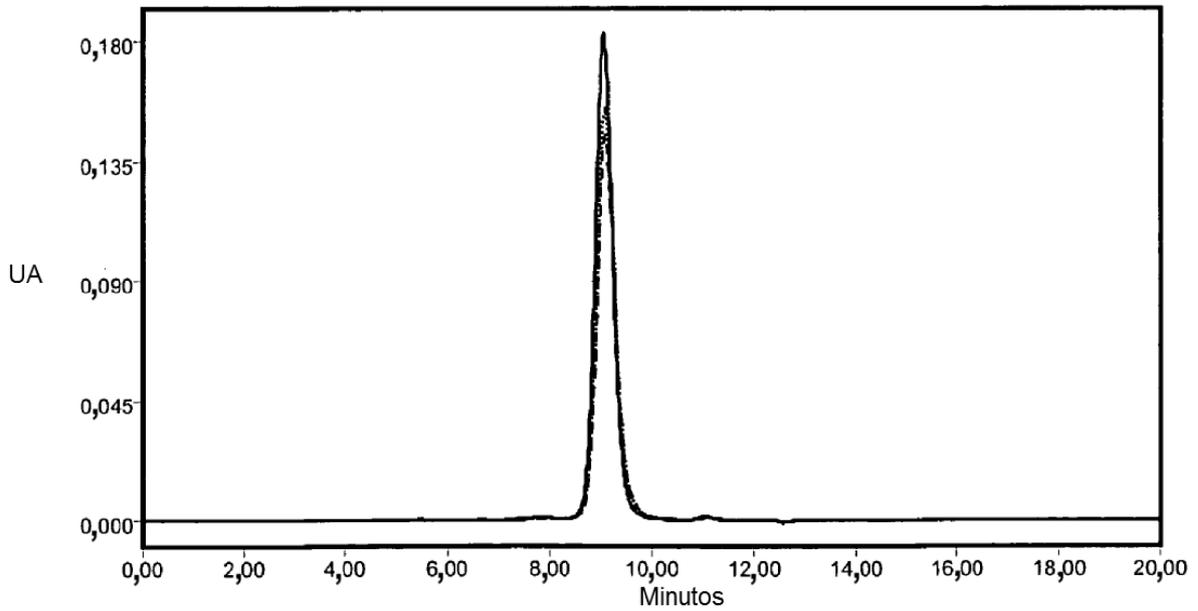
**Figura 11 continuación...**

**G**



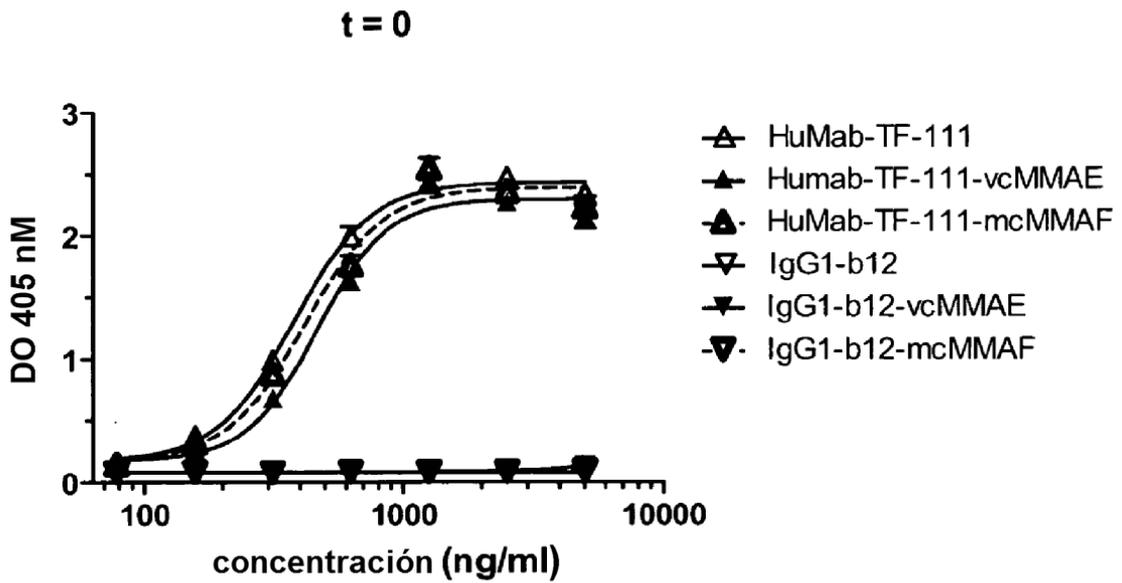
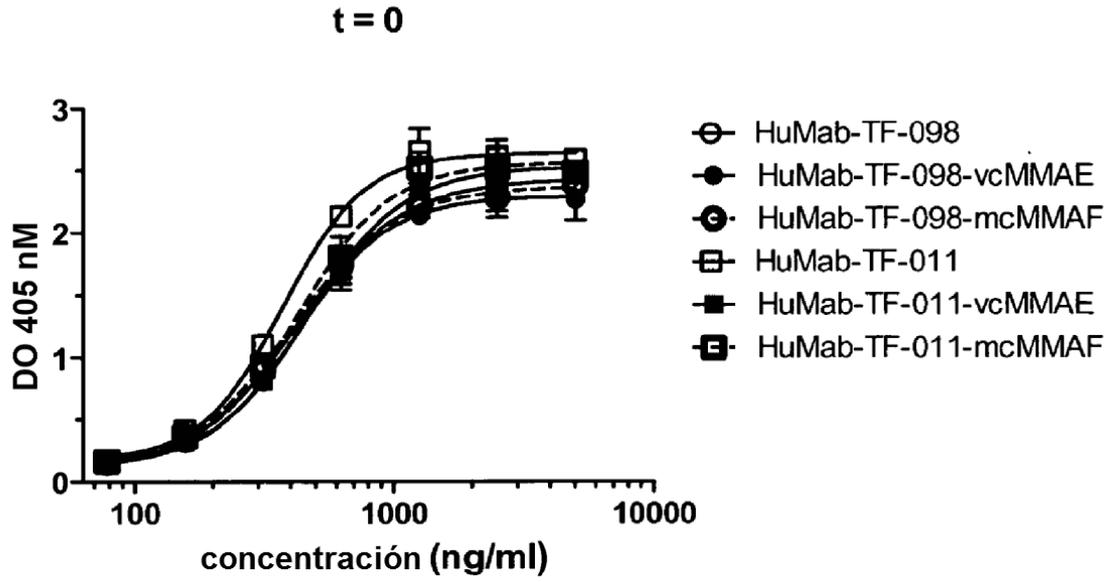
— IgG1-b12-vcMMAE  
 - - - IgG1-b12-vcMMAE, < -65°C, 3 meses  
 ..... IgG1-b12-vcMMAE, 5°C, 3 meses

**H**

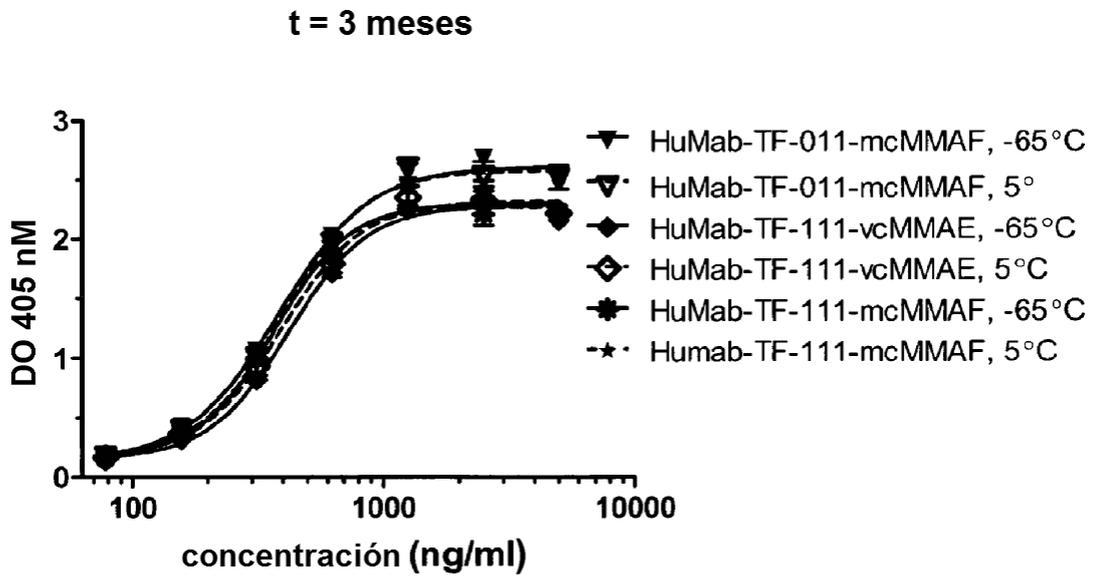
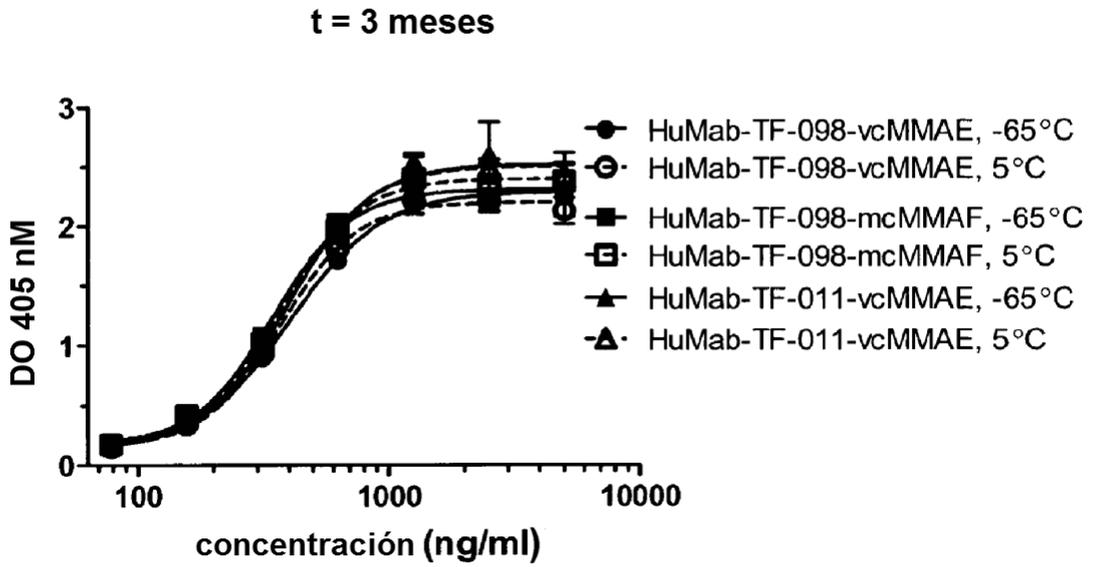


— IgG1-b12-mcMMAF  
 - - - IgG1-b12-mcMMAF, < -65°C, 3 meses  
 ..... IgG1-b12-mcMMAF, 5°C, 3 meses

**Figura 12**



**Figura 12 continuación**



**Figura 13**

