

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 514**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2012 PCT/EP2012/051679**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.08.2012 WO12104344**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2012 E 12702033 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2670440**

54 Título: **Anticuerpos humanos y conjugados de anticuerpo-fármaco contra CD74**

30 Prioridad:

01.02.2011 DK 201100064

01.02.2011 US 201161438383 P

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

18.02.2019

73 Titular/es:

GENMAB A/S (100.0%)

Kalvebod Brygge 43

1560 Copenhagen V , DK

72 Inventor/es:

VERPLOEGEN, SANDRA;

OVERDIJK, MARIJE;

DIJKHUIZEN, RIEMKE VAN;

BLEEKER, WILLEM KAREL;

BERKEL, PATRICK VAN;

PARREN, PAUL y

LISBY, STEEN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 700 514 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanos y conjugados de anticuerpo-fármaco contra CD74

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a anticuerpos específicos de CD74 y a conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés) de los mismos, a composiciones farmacéuticas de dichos anticuerpos o ADC y a su uso en aplicaciones terapéuticas.

10

Antecedentes de la invención

La cadena gamma del antígeno de histocompatibilidad de clase II de antígeno leucocitario humano (HLA, por sus siglas en inglés), también denominada cadena invariante asociada a antígeno Ia, Ii y CD74, es una proteína transmembrana con una cola citoplasmática corta. La función primaria de CD74 es regular la carga peptídica en los heterodímeros de cl complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de clase II en compartimentos intracelulares.

15

Solo una pequeña porción del contenido de CD74 celular total se expresa en la superficie celular. El CD74 de la superficie celular se internaliza muy rápidamente con y sin anticuerpos CD74 unidos (Roche PA et al., PNAS 1993; 90: 8581-8585; Hansen HJ et al., Biochem J 1996; 320: 293-300; Ong GL et al., Immunology 1999; 98:296-302). El nivel en estado estacionario del CD74 de superficie es por lo tanto bastante bajo, variando en los monocitos de unas pocas cientos a unas pocas miles de moléculas por célula.

20

La función exacta del CD74 expresado en la superficie celular no se conoce, pero los estudios han documentado el CD74 como un receptor de membrana para el factor de inhibición de migración (MIF, por sus siglas en inglés) de macrófagos de citocinas pro-inflamatorias. La unión de MIF a CD74 activa la señalización aguas abajo a través de las rutas MAPK y Akt y promueve la proliferación y la supervivencia celulares. Esta interacción está probablemente regulada también por la presencia de CD44, CXCR2 o CXCR4 como co-receptores.

25

30

La regulación positiva de la expresión de CD74 se ha observado en muchos tipos de cáncer, así como en ciertas infecciones y afecciones inflamatorias. Se han propuesto diversos formatos de un anticuerpo monoclonal específico de CD74 humanizado para el tratamiento de tumores CD74 positivos (Chang CH et al., Blood 2005;106:4308-4314; Sapa P et al., Clin Can Res 2005;11:5257-5264; Stein R et al., Blood 2004;104:3705-11; Govindan SV et al. J Nucl Med 2000;41:2089-2097; Hertlein E et al., Blood 2010; 116: 2554-2558; Stein R et al., Clin Cancer Res 2009; 15: 2808-2817; Sharkey RM et al., J Nucl Med 2009; 50: 444-453; Lundberg BB et al., Drug Deliv 2007; 14: 171-175; Griffiths GL et al., Int J Cancer 1999; 81: 985-992; Griffiths GL et al., Cancer Res 2003; 9: 6567-6571; Ochakovskaya R et al., Clin Cancer Res 2001; 7: 1505-1510; Shih L et al., Cancer Immunol Immunother; Burton JD et al., Clin Cancer Res 2004; 10: 6606-6611; Lundberg BB et al., J Control Release 2004; 94: 155-161).

35

40

El documento WO 03/074567 A2 se refiere al anticuerpo anti-CD74 humanizado hLL1, informando que induce la muerte de las células de linfoma humanas, y propone su uso en el tratamiento de tumores.

45

Aunque se han realizado muchos progresos, se mantiene una necesidad de métodos mejorados para tratar enfermedades graves, por ejemplo, tratamiento mejorado del cáncer, basándose en anticuerpos terapéuticos y ADC.

Sumario de la invención

El alcance de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Es un objeto de la presente invención proporcionar anticuerpos específicos de CD74 monoclonales novedosos altamente específicos y eficaces y ADC de dichos anticuerpos específicos de CD74. Los anticuerpos o los ADC de la invención exhiben características de unión a CD74 u otros efectos sobre células que expresan CD74 que difieren de los anticuerpos descritos en la técnica. Particularmente, los anticuerpos se caracterizan por una rápida internalización tras la unión a CD74, haciéndolos adecuados para aplicaciones terapéuticas en forma de ADC y para otras aplicaciones donde la rápida internalización es una ventaja. Los ADC novedosos se caracterizan por una alta eficiencia acabando con células tumorales que expresan CD74.

50

55

Como se expone en las reivindicaciones adjuntas, un anticuerpo de acuerdo con la invención es un anticuerpo aislado que se une a las variantes 1 y 2 de CD74, que comprende:

60

- (a) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 [011];
- (b) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 23 [005]; o
- (c) una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 [006].

65

Los anticuerpos y los ADC correspondientes pueden proporcionarse en una diversidad de formatos, incluyendo, pero no limitados a, formatos de fragmentos de anticuerpo y de anticuerpo biespecífico. En realizaciones preferidas, los anticuerpos son humanos.

- 5 Es también un objeto de la presente invención proporcionar ADC basados en dichos anticuerpos específicos de CD74 para su uso médico, proporcionando una forma eficaz y selectiva de provocar la muerte celular de las células tumorales.

10 Este y otros aspectos de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas y se describen con detalle adicional a continuación.

Breve descripción de los dibujos

15 **Figura 1:** Secuencias de aminoácidos de proteínas CD74 recombinantes usadas en los Ejemplos. CD74v1 y -v2, CD74del2-36v1 y -v2 e HisCD74v1 y -v2 corresponden a las SEQ ID NO: 1-6, respectivamente.

20 **Figura 2:** Alineamiento de las secuencias de cadena pesada variable (VH, por sus siglas en inglés) y ligera variable (VL, por sus siglas en inglés) de los anticuerpos de la presente invención. La SEQ ID NO de cada secuencia VH/VL se lista entre paréntesis a la derecha de la secuencia. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) de acuerdo con la nomenclatura IMTG se resaltan como sigue: las secuencias en cursiva representan CDR1, las secuencias subrayadas representan CDR2 y las secuencias en negrita representan CDR3.

25 **Figura 3:** Unión de anticuerpos específicos de CD74 a la proteína recombinante que representa el dominio extracelular de las isoformas variantes 1 y 2 (CD74v1 y CD74v2), determinadas por ELISA. Todos los anticuerpos humanos se produjeron co-transfectando transitoriamente células HEK-293F con vectores de expresión relevantes de cadena pesada y ligera.

Figura 4: Unión de anticuerpos específicos de CD74 en células Raji, determinadas por FACS. Todos los anticuerpos humanos se produjeron co-transfectando transitoriamente células HEK-293F con vectores de expresión relevantes de cadena pesada y ligera.

30 **Figura 5:** Reactividad cruzada de anticuerpos CD74 específicos con CD74 de macaco. La amígdala humana (panel superior) y los nodos linfáticos de macaco (panel inferior) se tiñeron con anticuerpos específicos de CD74. *: centro germinal; Mf: macrófagos; #: células B de la zona del manto.

35 **Figura 6:** Inducción dependiente de dosis de muerte celular por anticuerpos específicos de CD74 pre-incubados anti-kappa-ETA'. Se muestra un experimento representativo. Los datos mostrados son porcentajes de viabilidad promedio de pocillos duplicados de células tratadas con anticuerpos HuMab aCD74 pre-incubados anti-kappa-ETA'. La viabilidad en porcentaje se calculó como se describe en el Ejemplo 14.

Figura 7: Unión de anticuerpos HuMab CD74 005 y 006 (A) y 011 (B) y los ADC correspondientes a la proteína recombinante del dominio extracelular CD74v1, como se determina por ELISA. Se muestra un experimento representativo.

40 **Figura 8:** Unión de anticuerpos HuMab CD74 005 y 006 (A) y 011 (B) y los ADC correspondientes a CD74 expresado en superficie, determinado por análisis FACS en células Daudi. Los datos mostrados son intensidades de fluorescencia promedio (MFI, por sus siglas en inglés), calculados a partir de tres experimentos independientes.

45 **Figura 9:** Inducción dependiente de dosis de la muerte celular por ADC específicos de CD74. Un experimento representativo se muestra para cada una de las siguientes líneas celulares: Daudi (A), Raji (B), M4A4 (C) y NCI-H747 (D). Los datos mostrados son porcentajes de supervivencia de pocillos de células tratadas con ADC específicos de CD74.

50 **Figura 10:** Efectividad *in vivo* de ADC específicos de CD74 en el tratamiento de xenoinjertos de Daudi-luc en ratones SCID. Los ratones con tumores de Daudi-luc establecidos se trataron con ADC específicos de CD74. Los datos mostrados son señales de formación de imagen de bioluminiscencia (BLI, por sus siglas en inglés) promedio \pm S.E.M. por grupo (n = 7 ratones por grupo).

Figura 11: Efectividad *in vivo* de ADC específicos de CD74 en el tratamiento de xenoinjertos de Raji-luc en ratones SCID. Los ratones con tumores de Raji-luc establecidos se trataron con ADC específicos de CD74. Los datos mostrados son volúmenes medios del tumor \pm S.E.M. por grupo (n = 7 ratones por grupo).

55 **Figura 12:** Efectividad *in vivo* de ADC específicos de CD74 en el tratamiento de xenoinjertos de Raji en ratones SCID. Los ratones con tumores de Raji s.c. establecidos se trataron con ADC específicos de CD74. Los datos mostrados son volúmenes medios del tumor \pm S.E.M. por grupo (n = 6 ratones por grupo).

Figura 13: Efectividad *in vivo* de ADC anti-CD74 en el tratamiento terapéutico de xenoinjertos M4A4 en ratones SCID. Los ratones con tumores M4A4 establecidos se trataron con ADC anti-CD74. Los datos mostrados son volúmenes medios del tumor \pm S.E.M. por grupo (n = 7 ratones por grupo).

60 **Figura 14:** Determinación de las tasas de anticuerpos HuMab específicos de CD74. Se muestra un experimento representativo. Los datos mostrados son intensidades de fluorescencia (MFI) de pocillos triplicados de células incubadas con anticuerpos HuMab CD74 marcados con el tinte Alexa Fluor 488®, seguido de incubación con anticuerpos HuMab CD74 sin marcar para los intervalos de tiempo indicados.

65 **Figura 15:** Internalización y acumulación dependientes de tiempo de anticuerpos HuMab anti-CD74. Se muestra un experimento representativo para cada línea celular. Los datos mostrados son intensidades de fluorescencia medias (MFI) de pocillos duplicados incubados con anticuerpos HuMab anti-CD74 marcados con Alexa Fluor

488. Las células Daudi se incubaron con anticuerpos HuMab anti-CD74 marcados con Alexa-488 a 4 °C (A) o 37 °C (B). Las células Raji (C) y las células M4A4 (D) se incubaron a 37 °C.

Figura 16: Efectividad *in vivo* de anticuerpos HuMab anti-CD74 en el tratamiento profiláctico de xenoinjertos Daudi luc en ratones SCID. Los ratones se trataron con anticuerpos HuMab CD74 en una hora después de la inoculación de tumores Daudi. Los datos mostrados son señales BLI medias \pm S.E.M. por grupo (n = 7 ratones por grupo).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Los términos “CD74” y “antígeno CD74” se usan intercambiamente en el presente documento. Salvo que se especifique de otra manera, los términos incluyen cualquier variante, isoforma y homólogos de especie del CD74 humano que se expresan de forma natural por las células o se expresan en células transfectadas con el gen del CD74. Se sabe que existen al menos cuatro isoformas humanas; p43, p41, p35 y pp33 (Borghese F et al., *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15(3): 237-251). Esto resulta de un corte y empalme de transcritos alternativo y dos sitios de inicio de la traducción. p43 (también conocido como isoforma 1 de CD74, isoforma a o “larga”; véase entrada de UniProt P04233-1 y Secuencia de Referencia de NCBI NP 001020330) contiene 296 aminoácidos, formando los restos 73-296 la porción extracelular. Las construcciones proteicas de CD74 que tienen la parte extracelular de la isoforma 1 se denominan en el presente documento “variante 1” o “CD74v1”. p35 (también conocido como isoforma 2 de CD74, isoforma b o “corta”; véase entrada de UniProt P04233-2 y Secuencia de Referencia de NCBI NP 004346) carece de los restos 209-272 de la parte extracelular debido a corte y empalme alternativo. Las construcciones proteicas de CD74 que tienen la parte extracelular de la isoforma 2 se denominan en el presente documento “variante 2” o “CD74v2”. p41 y p33 surgen de un sitio de inicio de la traducción alternativo (48 pb aguas abajo; proteína 16 aminoácidos más corta) dando lugar a variantes que carecen de la señal de retención del retículo endoplasmático (RE) que está presente dentro de estos 16 aminoácidos, pero que tiene una parte extracelular idéntica a p43 y p35, respectivamente. La secuencia de otra isoforma (conocida como isoforma 3 e isoforma c), en donde los restos 148-160 se reemplazan y los restos 161-296 no están, se proporciona en el documento NP 001020329. Las secuencias de los homólogos de CD74 de macaco se proporcionan, por ejemplo, en la Secuencia de Referencia de NCBI: XP_001099491.2 y en la Secuencia de Referencia de NCBI: XP_002804624.1.

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 mediante enlaces disulfuro. La estructura de las inmunoglobulinas se ha caracterizado muy bien. Véase por ejemplo *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2a ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Brevemente, cada cadena pesada está típicamente 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 típicamente comprendida por tres dominios, C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Cada cadena ligera está típicamente comprendida por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como V_L o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está típicamente comprendida por un dominio, C_L o CL. Típicamente, la numeración de los restos de aminoácidos en la región constante se realiza de acuerdo con el índice EU como se describe en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad (o regiones hipervariables que pueden ser hipervariables en secuencia y/o formar bucles estructuralmente definidos), también denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR, por sus siglas en inglés). Cada V_H y V_L está compuesta típicamente por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el amino terminal hasta el carboxi terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (véase también Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196, 901 917 (1987)).

El término “anticuerpo” o “Ac” 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 la misma, que tiene la capacidad de unirse específicamente a un antígeno en condiciones fisiológicas típicas con una vida media 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 ocho horas, al menos aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas o más, aproximadamente 48 horas o más, aproximadamente tres, cuatro, cinco, seis, siete o más días, etc., o cualquier otro periodo funcionalmente definido relevante (tales como un tiempo suficiente para inducir, promover, potenciar y/o modular una respuesta fisiológica asociada a la unión de anticuerpo al antígeno y/o tiempo suficiente para que el anticuerpo reclute una actividad efectora). Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de inmunoglobulina contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos (Ac) pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o los factores hospedadores, incluyendo diversas células del sistema inmune (tales como las células efectoras) y componentes del sistema del complemento tales como C1q, el primer componente en la ruta clásica de activación del complemento. Un anticuerpo también puede ser multiespecífico, teniendo especificidades por dos o más epítomos diferentes, típicamente que no se superponen. Los ejemplos de anticuerpos multiespecíficos incluyen anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y

moléculas de anticuerpos similares. Como se indica anteriormente, el término anticuerpo en el presente documento, salvo que se indique de otra manera o se contradiga claramente por el contexto, incluye fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unirse específicamente al antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa, por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')₂. También debe entenderse que el término anticuerpo, salvo que se especifique de otra manera, también incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAc), polipéptidos de tipo anticuerpo tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Un anticuerpo como se genera puede poseer cualquier isotipo.

Las frases “anticuerpo humano”, “Ac humano” o “HuMab”, como se usa en el presente documento, se entiende que incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la presente invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la frase “anticuerpo humano”, como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en donde se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamífero, tales como un ratón, sobre secuencias marco humanas.

Como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano “deriva de” una secuencia de la línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema que usa secuencias de inmunoglobulinas humanas, por ejemplo inmunizando a un ratón transgénico que lleva genes de inmunoglobulinas humanas o cribando una biblioteca génica de inmunoglobulinas humanas y en donde el anticuerpo humano seleccionado es al menos un 90 %, tal como al menos un 95 %, por ejemplo al menos un 96 %, tal como al menos un 97 %, por ejemplo al menos un 98 % o tal como al menos un 99 % idéntico en su secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Típicamente, fuera de la cadena pesada CDR3, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de la línea germinal humana particular no mostrará más de 20 aminoácidos diferentes, por ejemplo, no más de 10 aminoácidos diferentes, tales 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 la línea germinal.

Las frases “anticuerpo monoclonal”, “Ac monoclonal”, “composición de anticuerpo monoclonal”, “mAc” o similares, como se usan en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una especificidad de unión única y afinidad por un epítipo particular. En consecuencia, la frase “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que muestran una única especificidad de unión que tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos monoclonales humanos pueden producirse por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico o trans-cromosómico, tales como un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera, fusionado a una célula inmortalizada.

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

La frase “anticuerpo de longitud completa” cuando se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que contiene todos los dominios constantes y variables de cadena pesada y ligera que se encuentran normalmente en un anticuerpo de ese isotipo.

Cuando se usan en el presente documento, salvo que se contradiga por el contexto, la frase “brazo Fab” o “brazo” se refiere a un par de cadena pesada-cadena ligera.

Cuando se usa en el presente documento, salvo que se contradiga por el contexto, la frase “región Fc” se refiere a una región de anticuerpo que comprende al menos una región bisagra, un dominio C_H2 y un dominio C_H3.

Un “anticuerpo deficiente en la función efectora” o un “anticuerpo de función efectora deficiente” se refieren a un anticuerpo que no tiene capacidad o es significativamente reducida de activar uno o más mecanismos efectores, tales como la activación del complemento o la unión al receptor Fc. De esta manera, los anticuerpos de función efectora deficiente no tienen capacidad o es significativamente reducida para mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés) y/o la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (CDC). Un ejemplo de dicho anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG4 o una forma del mismo con bisagra estabilizada. Otro ejemplo es la introducción de mutaciones en la región Fc que puede reducir fuertemente la interacción con proteínas del complemento y receptores Fc. Véase, por ejemplo, Bolt S et al., Eur J Immunol 1993, 23:403-411; Oganessian, Acta Crys. 2008, D64, 700-704; y Shields et al., JBC 2001, 276: 6591-6604.

Como se usa en el presente documento, la frase “célula efectora” se refiere a una célula inmune que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmune, en oposición a las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmune. Las células inmunes ejemplares incluyen una célula de un origen mieloide o linfoide, por ejemplo linfocitos

(tales como células B y células T incluyendo células T (CTL, por sus siglas en inglés), linfocitos citotóxicos naturales, macrófagos, monocitos, mastocitos y granulocitos, tales como neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores Fc (FcR, por sus siglas en inglés) específicos y llevan a cabo funciones inmunes específicas. En algunas realizaciones, una célula efectora es capaz de inducir ADCC, tales como una célula citotóxica natural. Por ejemplo, los monocitos, los macrófagos, que expresan FcR, están implicados en la muerte específica de células diana y en la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmune. En algunas realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o una célula diana. La expresión de un FcR particular o una célula efectora puede regularse por factores humorales tales como citocinas. Una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana o fagocitar o lisar una célula diana.

En el contexto de la presente invención, un "ADC" se refiere a un conjugado anticuerpo-fármaco, en el contexto de la presente invención refiriéndose típicamente a un anticuerpo específico de CD74, que se acopla a otro resto como se describe en la presente solicitud.

Un "anticuerpo CD74", "anticuerpo anti-CD74", "Ac CD74", "anticuerpo específico de CD74" o "Ac anti-CD74" es un anticuerpo como se describe anteriormente, que se une específicamente al antígeno CD74.

El anticuerpo de la invención está aislado. Un "Ac aislado", como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD74 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CD74). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, una isoforma o una variante del CD74 humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo de otras especies (tales como homólogos de especies de CD74). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. En una realización, dos o más anticuerpos monoclonales "aislados" que tienen diferentes especificidades de unión a antígeno se combinan en una composición bien definida.

Cuando se usan en el presente documento en el contexto de dos o más anticuerpos, la frase "compite con" o "compite cruzado con" indica que los dos o más anticuerpos compiten por la unión a CD74, por ejemplo, a las variantes 1, 2 o ambas de CD74. Por ejemplo, las construcciones descritas en el Ejemplo 1 pueden usarse en un ensayo tal. En un tipo de ensayo ejemplar, CD74 se recubre sobre una placa y se permite unir al primer anticuerpo, después de lo cual se añade el segundo anticuerpo marcado. Si la presencia del primer anticuerpo reduce la unión del segundo anticuerpo, los anticuerpos compiten. La frase "compite con" cuando se usa en el presente documento también pretende abarcar combinaciones de anticuerpos donde un anticuerpo reduce la unión de otro anticuerpo, pero donde no se observa competición cuando los anticuerpos se añaden en el orden inverso.

El término "epítipo" significa un determinante proteico capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los epítopos habitualmente consisten en agrupamientos de superficie de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tienen habitualmente características estructurales tridimensionales, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen por que la unión del primero pero no del último se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes. El epítipo puede comprender restos de aminoácidos que están directamente implicados en la unión, tales como restos de aminoácidos que se bloquean o cubren efectivamente por el péptido de unión específicamente a antígeno (en otras palabras, el resto de aminoácido está dentro de la huella dactilar del péptido de unión específicamente a antígeno).

Como se usa en el presente documento, el término "unión" en el contexto de la unión de un anticuerpo a un antígeno o un epítipo predeterminados es típicamente una unión con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-7} M o menos, tales como aproximadamente 10^{-8} M o menos, tales como aproximadamente 10^{-9} M o menos, aproximadamente 10^{-10} M o menos o aproximadamente 10^{-11} M o menos cuando se determina por ejemplo mediante tecnología de resonancia de plasmón superficial (RPS) en un instrumento BIAcore 3000 usando una forma soluble del antígeno como el ligando y el anticuerpo como el analito. Típicamente, un anticuerpo se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos diez veces menor, tales como al menos 100 veces menor, por ejemplo al menos 1000 veces menor, tales como al menos 10 000 veces menor, por ejemplo al menos 100 000 veces menor que su K_D para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína), que no es idéntico o estrechamente relacionado con el antígeno predeterminado. Cuando la K_D del anticuerpo es muy baja (esto es, el anticuerpo tiene una alta afinidad, entonces la K_D con la que se une al antígeno es típicamente al menos 10 000 veces menor que su K_D por un antígeno no específico).

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 Ac-antígeno particular. Dicho valor también se denomina el 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 Ac-antígeno particular.

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

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

5 Como se usa en el presente documento, "internalización", cuando se usa en el contexto de un anticuerpo CD74 incluye cualquier mecanismo por el que el anticuerpo se internaliza desde la superficie celular en una célula que expresa CD74. La internalización de un anticuerpo puede evaluarse en un ensayo indirecto midiendo el efecto de un conjugado Ac internalizado-toxina o una toxina específicamente unida a un anticuerpo por pre-incubación (tal como, por ejemplo, el ensayo anti-kappa-ETA del Ejemplo 14).

10 Como se usa en el presente documento, la frase "inhibe el crecimiento" (por ejemplo con respecto a las células, tales como células tumorales) pretende incluir cualquier disminución medible en el crecimiento celular cuando se pone en contacto con un anticuerpo CD74 o ADC en comparación con el crecimiento de las mismas células sin contacto con un anticuerpo CD74 o ADC, por ejemplo, la inhibición del crecimiento de un cultivo celular en al menos aproximadamente un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 99 % o un 100 %. Dicha disminución en el crecimiento celular puede ocurrir por una diversidad de mecanismos, por ejemplo, internalización, fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), muerte celular mediada por fármaco y/o apoptosis.

20 La presente invención también proporciona anticuerpos que comprenden variantes funcionales de la región V_L o la región V_H o una o más CDR de los anticuerpos de los ejemplos. Una variante funcional de una V_L , V_H o CDR usadas en el contexto de un anticuerpo CD74 todavía permite que el anticuerpo retenga una proporción sustancial (al menos aproximadamente un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 % o más) de la afinidad/avidez y/o la especificidad/selectividad del anticuerpo parental y en algunos casos dicho anticuerpo CD74 puede asociarse con mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el Ac parental.

30 Dichas variantes funcionales retienen típicamente la identidad de secuencia significativa del Ac parental. El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = $n.^{\circ}$ de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$ total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para la alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias pueden lograrse usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes a continuación.

35 El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótido puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.cgc.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. La identidad en porcentaje entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos también puede determinarse usando el algoritmo descrito por 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, la identidad en porcentaje entre dos secuencias de aminoácido puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (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.cgc.com>), usando bien 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.

50 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 un 35 %, aproximadamente un 50 % o más, aproximadamente un 60 % o más, aproximadamente un 70 % o más, aproximadamente un 75 % o más, aproximadamente un 80 % o más, aproximadamente un 85 % o más, aproximadamente un 90 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 65-95 %, tal como aproximadamente un 92 %, un 93 % o un 94 %) de las sustituciones en la variante son reemplazamientos de restos de aminoácidos conservativos.

55 Las secuencias de variantes de CDR pueden diferir de la secuencia de las CDR de las secuencias del anticuerpo parental a través de sustituciones en su mayoría conservativas; por ejemplo al menos 10, tales como al menos 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 de las sustituciones en la variante son reemplazamientos de restos de aminoácidos conservativos.

60 La frase "anticuerpo IgG4 estabilizado" se refiere a un anticuerpo IgG4 que se ha modificado para reducir el intercambio de media molécula (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional WO2008145142 o van der Neut Kofschoten M et al. (2007) Science 14;317(5844) y las referencias en las mismas).

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

65

Clases de restos de aminoácidos para sustituciones conservativas

Restos ácidos	Asp (D) y Glu (E)
Restos básicos	Lys (K), Arg (R) y His (H)
Restos hidrófilos sin carga	Ser (S), Thr (T), Asn (N) y Gln (Q)
Restos alifáticos sin carga	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I)
Restos no polares sin carga	Cys (C), Met (M) y Pro (P)
Restos aromáticos	Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W)

Clases de sustitución de restos de aminoácidos conservativos alternativas

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

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

Restos que contienen grupo alcohol	S y T
Restos alifáticos	I, L, V y M
Restos asociados a cicloalqueno	F, H, W e Y
Restos hidrófobos	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W y T
Restos cargados negativamente	D y E
Restos polares	C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T
Restos cargados positivamente	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 giros	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 agrupaciones de sustituciones conservativas incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina y asparagina-glutamina.

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

15 La conservación en términos de propiedades hidropáticas/hidrófilas y de peso/tamaño de los restos también se retiene 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 que son al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 65-99%) retenidos). Por ejemplo, las sustituciones conservativas de restos pueden ser o alternativamente pueden basarse en el remplazamiento de
20 grupos de conservación basados en el peso fuerte o débil, que se conocen en la técnica.

25 La retención de restos similares puede además o alternativamente basarse en una puntuación de similitud, como se determina por 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 exhiben típicamente al menos aproximadamente un 45 %, al menos aproximadamente un 55 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 % o más (por ejemplo, aproximadamente un 70-99 %) similarmente al péptido parental.

30 El término "vector", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular en donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de realizar replicación autónoma en una célula hospedadora en donde se introducen (por

ejemplo vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamíferos episómicos). Otros vectores (tales como vectores de mamíferos no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras la introducción en la célula hospedadora y por lo tanto se replican junto con el genoma del hospedador. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se denominan en el presente documento “vectores de expresión recombinantes” (o simplemente, “vectores de expresión”). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, “plásmido” y “vector” pueden usarse intercambiamente ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la presente invención pretende incluir dichas formas distintas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (tales como retrovirus defectuosos en la replicación, adenovirus y virus adeno-asociados), que sirven para funciones equivalentes.

La frase “célula hospedadora recombinante” (o simplemente “célula hospedadora”) como se usa en el presente documento, pretende referirse a una célula en donde se ha introducido un vector de expresión. Debe entenderse que dichos términos pretenden referirse no solamente a la célula objeto particular, sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en las generaciones posteriores debido bien a mutación o a influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluyen dentro del ámbito de la frase “célula hospedadora” como se usa en el presente documento. Las células hospedadoras recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células HEK-293, PER.C6, células NS0 y células linfocíticas y células procariotas tales como *E. coli*.

El término “transfectoma”, como se usa en el presente documento, incluye células hospedadoras eucariotas recombinantes que expresan el Ac, tales como células CHO, PER.C6, células NS0, células HEK-293, células vegetales u hongos, incluyendo células de levaduras.

La frase “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 humanas (bien integrados o bien no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es capaz de expresar Ac completamente humanos. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y bien un transgén de cadena pesada humana o bien un transcromosoma de cadena pesada humana, de tal manera que el ratón produce anticuerpos CD74 humanos cuando se inmuniza con el antígeno CD74 y/o células que expresan CD74. El transgén de la cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo el ratón HuMAb®, tales como el ratón HCo7 o el ratón HCo12, o el transgén de la cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como es el caso para el ratón KM como se describe en el documento WO02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos (denominados de forma colectiva en el presente documento “ratones transgénicos”) son capaces de producir isotipos múltiples de anticuerpos monoclonales humanos para un antígeno dado (tales como IgG, IgA, IgM, IgD y/o IgE) sometiéndolos a recombinación V-D-J y a intercambio de isotipo. El animal transgénico no humano también puede usarse para la producción de anticuerpos contra un antígeno específico introduciendo genes que codifican dicho Ac específico, por ejemplo ligando operativamente los genes a 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 estados de enfermedad.

Una “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo CD74 puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del anticuerpo CD74 de provocar una respuesta deseada en un individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en donde cualquier efecto tóxico o perjudicial se supera por los efectos beneficiosos terapéuticos.

Un anticuerpo “anti-idiotípico” (Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados al sitio de unión a antígeno de un Ac.

55 Aspectos y realizaciones adicionales de la invención

La invención proporciona un anticuerpo aislado, tal como un anticuerpo monoclonal humano, que se une a las isoformas 1 y 2 de CD74 humano y comprende secuencias V_H y V_L específicas como se define en las reivindicaciones. El anticuerpo puede unirse adicionalmente a otras isoformas u homólogos de especies de CD74, tales como el homólogo de macaco. En particular, el anticuerpo de la invención se internaliza eficientemente después de la unión a CD74 expresado en la superficie de una célula, que es ventajoso para aplicaciones terapéuticas de un enfoque ADC. Como se muestra en los Ejemplos 19 a 22, los ADC de anticuerpos CD74 y las combinaciones de conector-fármaco vcMMAE o mcMMAF redujeron eficazmente el tamaño de los tumores en varios modelos de tumor *in vivo*. Los ADC de CD74 fueron sorprendentemente eficaces a pesar de la baja expresión de superficie de la diana CD74 en las células tumorales (Ejemplo 22). Además, los anticuerpos CD74 se mostraron eficaces en la prevención del sobrecrecimiento de tumores en un modelo *in vivo* de profilaxis tumoral (Ejemplo 25).

El anticuerpo puede caracterizarse además por una o más propiedades funcionales tales como que se une a una o más variantes de CD74 humanas con alta afinidad, inhibe la unión de MIF a CD74 o cualquier combinación de las propiedades anteriores.

- 5 En un aspecto, el anticuerpo de la invención se une con alta afinidad a las variantes 1 y/o 2 de CD74 humanas o a las células humanas que expresan de forma natural CD74. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo (a) se une al dominio extracelular de la variante 1 de CD74 con una CE_{50} (afinidad aparente) de menos de aproximadamente 500 ng/ml, menos de aproximadamente 400 ng/ml, menos de aproximadamente 350 ng/ml o menos de aproximadamente 330 ng/ml; (b) se une al dominio extracelular de la variante 2 de CD74 con una CE_{50} de menos de aproximadamente 400 ng/ml, menos de aproximadamente 300 ng/ml, menos de aproximadamente 250 ng/ml o menos de aproximadamente 220 ng/ml; o (c) ambas de (a) y (b), cuando se determina como se describe en el Ejemplo 11. Además, o alternativamente, el anticuerpo puede unirse a CD74 en células Raji con un CE_{50} de menos de aproximadamente 400 mg/ml, menos de aproximadamente 300 ng/ml, menos de aproximadamente 250 ng/ml o menos de aproximadamente 200 ng/ml, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 12. Además, o alternativamente, el anticuerpo puede unirse a las variantes 1, 2 o ambas de CD74 con una K_D de aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como aproximadamente 10^{-9} M o menos, o incluso aproximadamente 10^{-10} M o menos.

- 20 En un aspecto, el anticuerpo se internaliza después de la unión a CD74 expresado en la superficie de una célula. Esto puede determinarse de acuerdo con el ensayo descrito en el Ejemplo 24 usando anticuerpos marcados fluorescentemente, de acuerdo con el ensayo descrito en el Ejemplo 14, usando un enfoque de ADC que refleja la internalización de anticuerpos, o usando un método descrito en Ong GL et al., Immunology 1999;98:296-302; Hansen HJ et al., Biochem J 1996; 320: 293-300; Koch NG et al., J Immunol 1991; 147: 2643-2651; Roche PA et al., PNAS 1993; 90: 8581-8585). La célula puede ser de una línea de células B, tales como células Raji, o de otro tipo de línea celular tumoral inducida para expresar altos niveles de CD74 mediante el tratamiento con $IFN\gamma$ (por ejemplo, células de cáncer de colon HT-29 o células de melanoma SK-MEL-37). En una realización, la célula es una célula Raji. En otra realización, el anticuerpo tiene una CE_{50} de menos de aproximadamente 60 ng/ml, menos de aproximadamente 40 ng/ml, menos de aproximadamente 30 ng/ml o aproximadamente 25 ng/ml o menos induciendo la muerte de las células Raji en un ensayo ETA anti-kappa, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 14. Alternativamente, el anticuerpo tiene una CE_{50} entre aproximadamente 25 y aproximadamente 60 ng/l, aproximadamente 25 a 40 ng/ml o aproximadamente 25 a aproximadamente 30 ng/ml en dicho ensayo.

En un aspecto, un anticuerpo de la invención tiene una CE_{50} de menos de 30 ng/ml o una CE_{50} de aproximadamente 25 ng/ml o menos, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 14.

- 35 En un aspecto, el anticuerpo se caracteriza por su tasa de desactivación del antígeno CD74, expresado opcionalmente en la superficie de una célula. La tasa de desactivación puede determinarse, por ejemplo, usando un ensayo celular tal como el uno del Ejemplo 23, usando típicamente anticuerpos marcados fluorescentemente (o de otra manera) y determinando la tasa de desactivación a 0 °C. La célula puede ser de una línea de células B, tales como, por ejemplo, células Daudi o Raji, o de otro tipo adecuado de línea celular tumoral (por ejemplo, células M4A4 o células NCI-H747). En una realización, la célula es una célula Daudi. En una realización, el anticuerpo tiene una tasa de desactivación en el intervalo de 0,02 a $1,0 \text{ min}^{-1}$, tal como aproximadamente 0,03 a aproximadamente $0,30 \text{ min}^{-1}$, tales como 0,04 o 0,10 o 0,15 a $0,30 \text{ min}^{-1}$. En una realización, el anticuerpo tiene una tasa de desactivación de aproximadamente $0,07 \text{ min}^{-1}$. En una realización, el anticuerpo tiene una tasa de desactivación de aproximadamente 0,20 o $0,24 \text{ min}^{-1}$.

- 45 El anticuerpo de la invención puede caracterizarse por competir en cruzado con, o unirse al mismo epítipo que, un anticuerpo de referencia a la variante 1, a la variante 2 o ambas variantes 1 y 2 de CD74 humano.

- 50 Una prueba de ensayo para la unión competitiva del anticuerpo con un anticuerpo de referencia puede utilizar, por ejemplo, el dominio extracelular de una variante CD74 (por ejemplo, las construcciones descritas en el Ejemplo 1), células que expresan CD74 y/o membranas celulares preparadas a partir de células que expresan CD74. En un ensayo ejemplar, las células que expresan CD74 se pre-incubaron con el anticuerpo de ensayo a diferentes concentraciones, que varían de 1 a 100 μg , posteriormente se incubaron con un anticuerpo de referencia marcado con fluoróforo a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. La unión del anticuerpo de referencia se determina usando análisis FACS.

En un aspecto, el anticuerpo compite por la unión a las variantes 1 y 2 del CD74 humano con al menos un anticuerpo de referencia seleccionado de:

- 60 (a) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 23 **[005]**;
- (b) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 **[006]**;
- 65 (c) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 y una región VL que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 **[008]**; y
- (d) un anticuerpo que comprende una región VH que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 y una región VL

que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 **[011]**.

En realizaciones separadas y específicas, el anticuerpo compite con el anticuerpo de (a) y (b), (a) y (c), (a) y (d), (b) y (c), (b) y (d), (c) y (d), al menos tres de (a) a (d), o todos de (a), (b), (c) y (d).

5 En una realización, el anticuerpo se une al mismo epítipo en CD74 humano como al menos uno de los anticuerpos de referencia definidos en (a), (b), (c) y (d). Esto puede determinarse usando técnicas conocidas para la determinación de epítopos, tales como, por ejemplo, probando la unión de anticuerpo a variantes de CD74 con mutaciones puntuales que difieren, o técnicas de visualización de fagos (véase, por ejemplo, Binder et Cancer Res 10 2007;67:3518-3523; Carter JM et al., Curr Protocols Immunol 2004; Ch 9: Unit 9.4; Hjelm B et al., N Biotechnol 2010; 27: 129-137; Rockberg J et al., Curr Protocols Immunol 2010; Ch 9: Unit 9.9; Benjamin DC et al., Methods 1996; 9: 508-515).

15 Un anticuerpo o inmunoglobulina de la invención se caracteriza por secuencias V_H y V_L específicas, como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, el anticuerpo o la inmunoglobulina comprende la región CDR3 V_H de uno cualquiera de HuMab-CD74-005, -006 y -011. La invención proporciona de esta manera un anticuerpo o una inmunoglobulina que comprenden un CDR3 V_H que comprende o que consiste en una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 10, 14 y 20 22. En una realización, el anticuerpo o la inmunoglobulina comprende SEQ ID NO: 22.

En un aspecto, el anticuerpo o la inmunoglobulina comprende una región V_L que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 24, AAS y SEQ ID NO: 26 y

- 25 a) una región V_H que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 8, 9 y 10 **(005)**;
 b) una región V_H que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 12, 13 y 14 **(006)**; o
 c) una región V_H que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 20, 21 y 22 **(011)**.

30 En un aspecto, el anticuerpo comprende una región V_H que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 20, 21 y 22 y una región V_L que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 24, AAS y 25. En una realización, el anticuerpo comprende una región V_H que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 20, 21 y 22 y una región V_L que comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de SEQ ID NO: 24, AAS y SEQ ID NO: 25.

35 En un aspecto, el anticuerpo o la inmunoglobulina comprende una V_H que tiene un 100 % de identidad con una secuencia de región V_H seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 11 y 19.

En un aspecto, el anticuerpo o la inmunoglobulina comprende una V_L que tiene un 100 % de identidad con una secuencia de región V_L seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23 y 26.

40 En aspectos separados y específicos, el anticuerpo o la inmunoglobulina comprende una región V_H y V_L seleccionada de una cualquiera de las siguientes combinaciones:

- 45 a) una región V_H que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 y una región V_L que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 23 **(005)**;
 b) una región V_H que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 y una región V_L que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 **(006)**; o
 c) una región V_H que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 y una región V_L que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 **(011)**.

50 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o una inmunoglobulina que comprende una región V_L que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26. En una realización, el anticuerpo o la inmunoglobulina comprende la CDR3 de V_H de SEQ ID NO: 22. En otra realización, el anticuerpo comprende las secuencias CDR1, 2 y 3 de V_H de SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente.

55 El anticuerpo de la invención puede caracterizarse por uno o más de los rasgos funcionales o estructurales de los aspectos descritos anteriormente, o por cualquier combinación seleccionada de rasgos funcionales y estructurales. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo o la inmunoglobulina de la invención se caracteriza por una cualquiera de las siguientes características:

- 60 a) una CE_{50} de menos de 30 ng/ml o una CE_{50} de aproximadamente 25 ng/ml o menos en un ensayo anti-kappa ETA, cuando se determina como se describe en el Ejemplo 14;
 b) competir con, o unirse al mismo epítipo que, un anticuerpo que tiene las secuencias V_H y V_L de SEQ ID NO: 19 y 26, respectivamente;
 65 c) una tasa de desactivación en el intervalo de 0,03 a aproximadamente $0,30 \text{ min}^{-1}$, cuando se determina de acuerdo con el Ejemplo 23;
 d) una CDR3 de V_H que comprende la SEQ ID NO: 22;

- e) una combinación de (a) y (b);
- f) una combinación de (a) y (c);
- g) una combinación de (a) y (d);
- h) una combinación de (b) y (c);
- 5 i) una combinación de (b) y (d);
- j) una combinación de (c) y (d);
- k) una combinación de (a), (b), (c) y (d).

10 Los anticuerpos de la invención son preferentemente monoclonales. Los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden producirse por ejemplo mediante el método del hibridoma descrito en primer lugar por Kohler et al. (Nature 256, 495 (1975)) o puede producirse por métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse también 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). Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse de cualquier fuente adecuada. De esta manera, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse de hibridomas preparados a partir de células B esplénicas y de nodos linfáticos murinas obtenidas de ratones inmunizados con un antígeno de interés, por ejemplo en forma de células que expresan un antígeno de interés en la superficie, o un ácido nucleico que codifica un antígeno de interés. Los anticuerpos monoclonales pueden obtenerse también de hibridomas derivados de células que expresan anticuerpos de humanos inmunizados o mamíferos no humanos tales como ratas, perros, primates, etc.

20 En una realización, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo humano. Los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CD74 pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmune 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".

30 El ratón HuMAb contiene un minilocus del gen de la inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada (μ e γ) y ligera κ sin reordenar, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de las cadenas μ y κ endógenos (Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)). En consecuencia, los ratones exhiben una expresión reducida de IgM o κ de ratón y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos se someten a intercambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgG, κ humanos de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), *supra*; 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). Véanse también los 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, 40 WO 92/22645, WO 92/03918 y WO 01/09187.

45 Los ratones HCo7, HCo12, HCo17 y HCo20 tienen una disrupción en sus genes de la cadena ligera endógena (κ , κ) (como se describe en Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)), una disrupción de CMD en sus genes de la cadena pesada endógena (como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/14424) y un transgén de la cadena ligera kappa humana KCo5 (como se describe en Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)). Adicionalmente, los ratones HCo7 tienen un transgén de la cadena pesada humana HCo7 (como se describe en el documento US 5.770.429), los ratones HCo12 tienen un transgén de la cadena pesada humana HCo12 (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/14424) los ratones HCo17 tienen un transgén de la cadena pesada humana HCo17 (como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO 01/09187) y los ratones HCo20 tienen un transgén de la cadena pesada humana HCo20. Los ratones resultantes expresan los transgenes de las cadenas pesada y ligera kappa de inmunoglobulinas humanas en un fondo homocigoto para la disrupción de los loci de la cadena pesada y kappa ligera endógenos de ratón.

55 En la cepa de ratón KM, el gen de la cadena ligera kappa endógena de ratón se ha interrumpido de forma homocigota como se describe en Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993) y el gen de la cadena pesada endógena de ratón se ha interrumpido de forma homocigota como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO 01/09187. Esta cepa de ratón lleva un transgén de la cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996). Esta cepa de ratón también lleva un transcromosoma de cadena pesada humana compuesto por el fragmento hCF del cromosoma 14 (SC20) como se describe en el documento WO 02/43478. Los ratones HCo12-BALB/C pueden generarse cruzando HCo12 con KCo5[J/K]-Balb/C como se describe en el documento WO 097006.

60 Los esplenocitos y las células de los nodos linfáticos de estos ratones transgénicos pueden usarse para generar hibridomas que secreten anticuerpos monoclonales humanos de acuerdo con técnicas bien conocidas.

Los anticuerpos monoclonales o policlonales humanos pueden generarse también transgénicamente a través de la generación de otros mamíferos no humanos o plantas que son transgénicos para las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable de los mismos. En conexión con la producción de transgénicos en mamíferos, los anticuerpos pueden producirse en, y recuperarse de, la leche de las cabras, las vacas u otros mamíferos. Véanse, por ejemplo, los documentos US 5.827.690, US 5.756.687, US 5.750.172 y US 5.741.957.

Además, los anticuerpos humanos pueden generarse a través de tecnologías de tipo visualización, incluyendo, sin limitación, visualización de fagos, visualización retroviral, visualización de ribosomas y otras técnicas, usando técnicas bien conocidas en la materia y las moléculas resultantes pueden someterse a maduración adicional, tales como maduración de afinidad, ya que dichas técnicas se conocen en la materia (véase por ejemplo Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (visualización de fagos), Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996) (visualización de fagos), Hanes y Plutchau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997) (visualización de ribosomas), Parmley y Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (visualización de fagos), 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 TIBTECH 10, 80-84 (1992) y el documento US 5.733.743). Si se usan tecnologías de visualización para producir anticuerpos que no son humanos, dichos anticuerpos pueden humanizarse.

El anticuerpo de la invención puede ser de cualquier isotipo. La elección del isotipo típicamente vendrá guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como la inducción de ADCC. Los isotipos ejemplares son IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Puede usarse cualquiera de las regiones constante de cadena ligera humanas, kappa o lambda. Si se desea, la clase de un anticuerpo específico CD74 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 otra, por ejemplo, IgG1 a IgG2. De esta manera, 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.

En una realización, el anticuerpo de longitud completa es un anticuerpo IgG1, tal como un anticuerpo IgG1,k.

En otra realización, el anticuerpo de longitud completa es un anticuerpo IgG4.

En una realización particular, el anticuerpo IgG4 específico de CD74 es un anticuerpo IgG4 estabilizado. Los ejemplos de anticuerpos IgG4 estabilizados adecuados son anticuerpos en donde la arginina en la posición 409 en una región constante de cadena pesada de la IgG4 humana, que se indica en el índice EU como en Kabat et al. supra, se sustituye con lisina, treonina, metionina o leucina, preferentemente lisina (descrito en el documento WO2006033386) y/o en donde la región bisagra comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys. Otros anticuerpos IgG4 estabilizados adecuados se desvelan en el documento WO2008145142.

En una realización, el anticuerpo IgG4 estabilizado específico de CD74 es un anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en 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 en donde dicho anticuerpo opcionalmente comprende una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones adicionales, pero que no comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra. Preferentemente, dicho anticuerpo comprende un resto Lys o Ala en la posición que corresponde a 409 o la región C_H3 del anticuerpo se ha reemplazado por la región C_H3 de la IgG1 humana, de la IgG2 humana o de la IgG3 humana.

En otra realización, el anticuerpo IgG4 estabilizado específico de CD74 es un anticuerpo IgG4 que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en 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 en donde dicho anticuerpo opcionalmente comprende una o más sustituciones, deleciones y/o inserciones adicionales y donde dicho anticuerpo comprende una secuencia Cys-Pro-Pro-Cys en la región bisagra. Preferentemente, dicho anticuerpo comprende un resto Lys o Ala en la posición que corresponde a 409 o la región C_H3 del anticuerpo se ha reemplazado por la región C_H3 de la IgG1 humana, de la IgG2 humana o de la IgG3 humana.

En otra realización, el anticuerpo específico de CD74 es un anticuerpo de un tipo distinto de IgG4, por ejemplo, IgG1, IgG2 o IgG3 que se ha mutado de tal manera que la capacidad de mediar funciones efectoras, tales como ADCC, se ha reducido o incluso 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).

En una realización, los isótopos y/o las secuencias respectivos de las dos regiones constantes de cadena pesada (Fc) son los mismos. En otra realización, los isótopos y/o las secuencias respectivos de las dos regiones constantes de cadena pesada (Fc) de un único anticuerpo específico de CD74 son diferentes. Esto es particularmente aplicable a anticuerpos multiespecíficos, tales como biespecíficos, específicos de CD74, que se describen con detalle adicional a continuación.

En otro aspecto, el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno. Los fragmentos de anticuerpos pueden obtenerse por técnicas convencionales, tales como por fragmentación de anticuerpos de longitud completa o por expresión de ácidos nucleicos que codifican fragmentos de anticuerpo en células recombinantes (véase, por ejemplo Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)). Los fragmentos pueden ensayarse o cribarse de esta manera por sus propiedades de la misma manera que se describe en el presente documento para los anticuerpos de longitud completa. Lo siguiente describe formatos ejemplares para fragmentos de unión a antígeno específicos de CD74 de la invención:

Fragmentos $F(ab')_2$, que son fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra. Estos pueden generarse, por ejemplo, tratando un anticuerpo de longitud completa con pepsina.

Fragmentos Fab' o Fab, que son fragmentos monovalentes que consisten en los dominios V_L , V_H , C_L y C_H1 . Los fragmentos Fab pueden obtenerse, por ejemplo, tratando un anticuerpo IgG con papaína. Los fragmentos Fab' pueden obtenerse, por ejemplo, reduciendo los puentes disulfuro de un fragmento $F(ab')_2$ usando un agente reductor tal como ditiotreitól.

Anticuerpos monovalentes o "medias moléculas de anticuerpo", que existen en soluciones acuosas como un heterodímero de una cadena ligera única y cadena pesada única, se describen en el documento WO2007059782 (Genmab A/S).

Fragmentos Fd, que consisten esencialmente en los dominios V_H y C_H2 .

Fragmentos Fv, que consisten esencialmente en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo y anticuerpos de cadena única de los mismos. Los anticuerpos de cadena única (también conocidos como anticuerpos Fv de cadena única (scFV)) son construcciones donde los dominios V_L y V_H de un fragmento Fv se unen, usando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permite que se expresen como una cadena proteica única en donde las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (véase por ejemplo Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) y Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)).

Los dominios de anticuerpo (también denominados fragmentos dAb), que consisten esencialmente en un dominio V_H (véase, por ejemplo, Ward et al., Nature 341,544-546 (1989); Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90).

Otros formatos ejemplares incluyen camélidos o nanocuerpos (véase, por ejemplo, Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1): 111-24).

Formatos de anticuerpos multiespecíficos

En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer sitio de unión a antígeno a partir de una molécula de anticuerpo específica de CD74 descrita anteriormente en el presente documento y al menos un segundo sitio de unión a antígeno.

En una realización particular, el segundo sitio de unión a antígeno se usa para reclutar un mecanismo de muerte tales como, por ejemplo, uniendo un antígeno en una célula efectora humana o uniendo un agente citotóxico o un segundo agente terapéutico. Las células efectoras ejemplares incluyen una célula T, tales como, por ejemplo, una célula T citolítica (CTL), una célula citolítica natural (NK, por sus siglas en inglés), un macrófago, un monocito, un mastocito y un granulocito, tal como, por ejemplo, un neutrófilo, un eosinófilo y un basófilo. Los antígenos celulares efectoras ejemplares incluyen, pero no se limitan a CD1, CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD28, CD32, CD40, CD64, CD89, FcεRI y HLA-DR. Los agentes citotóxicos adecuados y los segundos agentes terapéuticos se ejemplifican a continuación e incluyen toxinas (tales como péptidos radiomarcados), agentes quimioterapéuticos y profármacos.

En otra realización particular, el segundo sitio de unión a antígeno se une a un antígeno en una célula B humana, tales como, por ejemplo, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD46, CD80, CD138 y HLA-DR.

En otra realización particular, el segundo sitio de unión a antígeno se une a un antígeno específico de tejido, promoviendo la localización del anticuerpo biespecífico a un tejido específico.

En otra realización particular, el segundo sitio de unión a antígeno se une a un antígeno localizado en el mismo tipo de célula que la célula que expresa CD74, típicamente un antígeno asociado a tumor (TAA, por sus siglas en inglés), pero tiene una especificidad de unión diferente de aquella del primer sitio de unión a antígeno. Dichos anticuerpos multi- o biespecíficos pueden potenciar la especificidad de la unión a células tumorales y/o acoplar múltiples rutas

efectoras. Los TAA incluyen antígeno carcinoembrionario (CEA, por sus siglas en inglés), antígeno específico de próstata (PSA, por sus siglas en inglés), RAGE (antígeno renal), α -fetoproteína, CAMEL (antígeno reconocido por CTL en melanoma), antígenos CT (tales como MAGE-B5, -B6, -C2, -C3 y D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSX-2, GAGE, BAGE, MAGE y SAGE), antígenos de mucina (por ejemplo, MUC1, mucina-CA125, etc.), antígenos de gangliósido, tirosinasa, gp75, c-Met, C-myc, Marti, MelanA, MUM-1, MUM-2, MUM-3, HLA-B7, Ep-CAM o una integrina asociada a cáncer, tales como integrina $\alpha 5\beta 3$. Alternativamente, el segundo sitio de unión a antígeno se une a un epítipo diferente de CD74. El segundo sitio de unión a antígeno puede unirse alternativamente a un factor angiogénico u otro factor de crecimiento asociado a cáncer, tales como un factor de crecimiento del endotelio vascular, un factor de crecimiento de fibroblastos, un factor de crecimiento epidérmico, angiogenina o un receptor de cualquiera de estos, particularmente receptores asociados al avance del cáncer.

En otra realización particular, el segundo sitio de unión a antígeno es de un segundo anticuerpo específico de CD74, tal como un anticuerpo específico de CD74 de la invención.

Los formatos ejemplares de las moléculas de anticuerpo multiespecíficas de la invención incluyen, pero no se limitan a (i) dos anticuerpos reticulados por heteroconjugación química, uno con una especificidad a CD74 y otra con una especificidad a un segundo antígeno; (ii) un anticuerpo único que comprende dos regiones de unión a antígeno diferentes; (iii) un anticuerpo de cadena única que comprende dos regiones de unión a antígeno diferentes, por ejemplo, dos scFv conectadas en tándem por un conector peptídico adicional; (iv) un anticuerpo de dominio variable dual (Ig-DVD), donde cada cadena ligera y cada cadena pesada contiene dos dominios variables en tándem a través de un enlace peptídico corto (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, En: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (v) un fragmento (Fab')₂ biespecífico químicamente unido; (vi) un Tandab, que es una fusión de dos diacuerpos de cadena única resultante en un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos diana; (vii) un flexicuerpo, que es una combinación de scFv con un diacuerpo dando como resultado una molécula multivalente; (viii) una denominada molécula de "acoplamiento y bloqueo", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" en la Proteína Quinasa A, que, cuando se aplica a Fab, puede producir una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (ix) una molécula denominada Escorpión, que comprende, por ejemplo, dos scFv fusionados a ambos términos de un brazo Fab; y (x) un diacuerpo.

Otro formato ejemplar para los anticuerpos biespecíficos es las moléculas de tipo IgG con dominios CH3 complementarios para forzar la heterodimerización. Dichas moléculas pueden prepararse usando tecnologías conocidas, tales como, por ejemplo, aquellas tecnologías conocidas como Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), Jnob-into-Hole (Genentech), CrossMAb (Roche) y unido electrostáticamente (Amgen), LUZ-Y (Genentech), cuerpo de Dominio Diseñado por Intercambio de Cadena (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonic (Merus) y DuoBody (Genmab A/S).

En una realización, el anticuerpo biespecífico se obtiene o es obtenible a través de un intercambio del brazo Fab, típicamente usando tecnología DuoBody. Los métodos *in vitro* para producir anticuerpos biespecíficos por intercambio de brazo Fab controlado se han descrito en los documentos WO 2008119353 y WO 2011131746 (ambos por Genmab A/S). En un método ejemplar, descrito en el documento WO 2008119353, se forma un anticuerpo biespecífico por intercambio del "brazo Fab" o de "media molécula" (intercambiando una cadena pesada y una cadena ligera fijada) entre dos anticuerpos mono-específicos, ambos comprendiendo regiones C_H3 tipo IgG4, tras la incubación en condiciones reductoras. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab que pueden comprender diferentes secuencias. En otro método ejemplar, descrito en el documento WO 2011131746, los anticuerpos biespecíficos de la presente invención se preparan por un método que comprende las siguientes etapas, en donde al menos uno del primer y el segundo anticuerpos es un anticuerpo CD74 de la presente invención:

- a) proporcionar un primer anticuerpo que comprende una región Fc de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una primera región CH3;
 - b) proporcionar un segundo anticuerpo que comprende una región Fc de una inmunoglobulina, comprendiendo dicha región Fc una segunda región CH3;
- en donde las secuencias de dicha primera y segunda regiones CH3 son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3;
- c) incubar dicho primer anticuerpo junto con dicho segundo anticuerpo en condiciones reductoras; y
 - d) obtener dicho anticuerpo biespecífico,

en donde el primer anticuerpo es un anticuerpo CD74 de la presente invención y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión diferente, o viceversa.

Las condiciones reductoras pueden proporcionarse, por ejemplo, añadiendo un agente reductor, por ejemplo, seleccionado de 2-mercaptoetilamina, ditiotreitil y tris(2-carboxietil)fosfina. La etapa d) puede comprender además restaurar las condiciones para volverse no reductoras o menos reductoras, por ejemplo, retirando un agente

reductor, por ejemplo, por desalación.

Preferentemente, las secuencias de la primera y la segunda regiones CH3 son diferentes, comprendiendo solo unas pocas mutaciones bastante conservativas asimétricas, de tal manera que la interacción heterodimérica entre dichas primera y segunda regiones CH3 es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dichas primera y segunda regiones CH3. Más detalles de estas interacciones y cómo pueden lograrse se proporcionan en el documento WO 2011131746. Lo siguiente son realizaciones ejemplares de combinaciones de dichas mutaciones asimétricas, opcionalmente en donde una o ambas regiones Fc son del isotipo IgG1.

10 En una realización, la primera región Fc tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 407 y 409 y la segunda región Fc tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 407 y 409 y en donde la primera y la segunda regiones Fc no están sustituidas en las mismas posiciones.

15 En una realización, la primera región Fc tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 405 y dicha segunda región Fc tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 407 y 409, opcionalmente 409.

20 En una realización, la primera región Fc tiene una sustitución de aminoácidos en la posición 409 y dicha segunda región Fc tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405 y 407, opcionalmente 405 o 368.

En una realización particular, tanto la primera como la segunda regiones Fc son del isotipo IgG1, teniendo la primera región Fc una Leu en la posición 405 y teniendo la segunda región Fc una Arg en la posición 409.

25

Conjugados

La presente invención proporciona un anticuerpo específico de CD74 conjugado a un resto terapéutico, es decir, un fármaco. El resto terapéutico puede ser, por ejemplo, una citotoxina, un agente quimioterapéutico, un inmunosupresor, un estimulante inmune, un péptido lítico o un radioisótopo. Dichos conjugados se denominan en el presente documento "conjugados anticuerpo-fármaco" o "ADC".

30

En consecuencia, en un aspecto, el anticuerpo de acuerdo con cualquier aspecto o realización descritos anteriormente se conjuga a un resto terapéutico. Los restos terapéuticos ejemplares incluyen un resto citotóxico, un radioisótopo, una citocina y un péptido lítico.

35

En una realización, el anticuerpo es capaz de inducir citotoxicidad en una célula Raji mediante la internalización del anticuerpo conjugado a o asociado a un resto terapéutico en la célula Raji, por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 14 o un tipo de ensayo similar. En una realización, el anticuerpo induce citotoxicidad por internalización como se describe en el Ejemplo 14, con un valor de CE₅₀ entre aproximadamente 25 ng/ml y aproximadamente 60 ng/ml, tales como entre 25 ng/ml y 30 ng/ml o un valor CE₅₀ de menos de 60 ng/ml, tales como menos de 40 ng/ml o menos de 30 ng/ml para inducir la muerte de las células Raji en un ensayo ETA' anti-kappa. En otra realización, un ADC de acuerdo con la presente invención induce citotoxicidad con un valor de CE₅₀ de menos de 10 ng/ml, tales como menos de 5 ng/ml, menos de 1 ng/ml, menos de 0,5 ng/ml o menos de 0,1 ng/ml induciendo la muerte de las células Raji u otras células que expresan CD74.

40

45

En una realización, el anticuerpo se conjuga a un resto citotóxico. El resto citotóxico puede, por ejemplo, seleccionarse del grupo que consiste en taxol; citocalasina B; gramicidina D; bromuro de etidio; emetina; mitomicina; etopósido; tenopósido; vincristina; vinblastina; colchicina; doxorubicina; daunorubicina; dihidroxi antracina diona; maitansina o un análogo o derivado de la misma; una auristatina o un análogo de péptido funcional o derivado del mismo; dolastina 10 o 15 o un análogo de la misma; irinotecano o un análogo del mismo; mitoxantrona; mitramicina; actinomicina D; 1-deshidrotestosterona; un glucocorticoide; procaína; tetracaína; lidocaína; propanolol; puromicina; calicheamicina o un análogo o derivado de la misma; un antimetabolito tal como metotrexato, 6 mercaptopurina, 6 tioguanina, citarabina, fludarabina, 5 fluorouracilo, decarbazina, hidroxurea, asparaginasa, gemcitabina o cladribina; un agente alquilante tal como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptoizocina, dacarbacina (DTIC), procarbocina, mitomicina C; un derivado de platino tal como cisplatina o carboplatina; duocarmicina A, duocarmicina SA, raquelmicina (CC-1065) o un análogo o derivado de los mismos; un antibiótico tal como dactinomicina, bleomicina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC); pirrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepinas (PDB); toxina diftérica y moléculas relacionadas tales como la cadena A diftérica y fragmentos activos de las mismas y moléculas híbridas, toxina ricina tal como ricina A o una toxina de la cadena de ricina A descglucosilada, toxina colérica, una toxina tipo Shiga tal como SLT I, SLT II, SLT IIV, toxina KT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina tetánica, inhibidor de la proteasa Bowman-Birk de soja, 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* tales como PAPI, PAPII y PAP-S, inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, toxinas gelonina, mitogelina,

65

restrictocina, fenomicina y enomicina; ribonucleasa (RNasa); DNasa I, enterotoxina A estafilocócica; proteína antivírica de fitolaca; toxina difterina; y endotoxina de *Pseudomonas*.

5 En una realización, el anticuerpo se conjuga a una auristatina o un análogo peptídico, un derivado o un profármaco de la misma. Las auristatinas se han demostrado interferir con las dinámicas de los microtúbulos, la hidrólisis del GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584) y tienen actividad anti-cáncer (documento US5663149) y antifúngica (Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents and Chemother. 42:2961-2965). Por ejemplo, puede hacerse reaccionar la auristatina E con ácido para-acetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados de auristatina típicos incluyen AFP, MMAF (monometil auristatina F) y MMAE (monometil auristatina E). Las auristatinas y los análogos, derivados y profármacos de auristatina adecuados, así como los conectores adecuados para la conjugación de auristatinas a los Ac, se describen en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 5.635.483, 5.780.588 y 6.214.345 y en las Publicaciones de solicitud de patente internacional WO2088172, WO2004010957, WO2005081711, WO2005084390, WO2006132670, WO03026577, WO200700860, WO207011968 y WO205082023.

15 En una realización, el anticuerpo se conjuga con pirrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepina (PBD) o un análogo, derivado o profármaco de la misma. Las PDB y los derivados de PDB adecuados y las tecnologías relacionadas se describen, por ejemplo, en Hartley J.A. et al., Cancer Res 2010; 70(17): 6849-6858; Antonow D. et al., Cancer J 2008; 14(3): 154-169; Howard P.W. et al., Bioorg Med Chem Lett 2009; 19: 6463-6466 y Sagnou et al., Bioorg Med Chem Lett 2000; 10(18): 2083-2086.

20 En una realización, el anticuerpo se conjuga a un resto citotóxico seleccionado del grupo que consiste en una antraciclina, maitansina, calicheamicina, duocarmicina, raquelmicina (CC-1065), dolastatina 10, dolastina 15, irinotecano, monometil auristatina E, monometil auristatina F, una PBD o un análogo, derivado o profármaco de cualquiera de los mismos.

30 En una realización particular, el anticuerpo se conjuga a una antraciclina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En otra realización particular, el anticuerpo se conjuga a maitansina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En otra realización particular, el anticuerpo se conjuga a calicheamicina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En otra realización particular, el anticuerpo se conjuga a duocarmicina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En otra realización particular, el anticuerpo se conjuga a raquelmicina (CC-1065) o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En otra realización particular, el anticuerpo se conjuga a dolastatina 10 o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En otra realización particular, el anticuerpo se conjuga a dolastina 15 o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En otra realización particular, el anticuerpo se conjuga a monometil auristatina E o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En otra realización particular, el anticuerpo se conjuga a monometil auristatina F o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En otra realización particular, el anticuerpo se conjuga a pirrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En otra realización particular, el anticuerpo se conjuga a irinotecano o un análogo, derivado o profármaco del mismo.

40 En una realización, un anticuerpo específico de CD74 de la invención se conjuga a un ácido nucleico o una molécula asociada a un ácido nucleico. En una de dicha realización, el ácido nucleico conjugado es una ribonucleasa citotóxica (RNasa) o una desoxirribonucleasa (por ejemplo, DNasa I), un ácido nucleico antisentido, una molécula de ARN inhibidora (por ejemplo, una molécula de ARNsi) o un ácido nucleico inmunoestimulante (por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un motivo CpG inmunoestimulante). En otra realización, un anticuerpo específico de CD74 de la invención se conjuga a un aptámero o una ribozima.

50 En una realización, un anticuerpo específico de CD74 de la invención se conjuga, por ejemplo, como una proteína de fusión, a un péptido lítico tales como CLIP, Magainina 2, melitina, Cecropina y P18.

En una realización, el anticuerpo se conjuga a una citocina, tales como, por ejemplo, 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 α , IFN β , IFN γ , GM-CSF, CD40L, ligando Flt3, factor de células madre, ancestim y TNF α .

55 En otra realización, el anticuerpo se conjuga a un radioisótopo o a un quelato que contiene un radioisótopo. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse a un conector quelante, por ejemplo, DOTA, DPTA o tiuxetano, que permite que el anticuerpo se compleje con un radioisótopo. El anticuerpo también o alternativamente puede comprender o conjugarse a uno o más aminoácidos radiomarcados u otras moléculas radiomarcadas. Un anticuerpo específico de CD74 radiomarcado puede usarse tanto para fines diagnósticos como terapéuticos. Los ejemplos no limitantes de radioisótopos incluyen ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{125}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{186}Re , ^{213}Bi , ^{225}Ac y ^{227}Th . Para fines terapéuticos, puede usarse un radioisótopo que emita radiación de partículas beta o alfa, por ejemplo, ^{131}I , ^{90}Y , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{67}Cu , ^{186}Re , ^{188}Re y ^{212}Pb .

65 Un agente terapéutico que puede administrarse en combinación con un anticuerpo específico de CD74 de la presente invención como se describe en algún lugar en el presente documento, tal como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, una citocina o quimiocina anti-cáncer, es también un candidato para un resto terapéutico útil para

la conjugación a un anticuerpo de la presente invención.

Un anticuerpo específico de CD74 de la presente invención puede también modificarse químicamente por conjugación covalente a un polímero para, por ejemplo, aumentar su vida media en circulación. Los polímeros
 5 ejemplares y los métodos para fijarlos a los polipéptidos, se ilustran, 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, con un peso molecular de entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 40 000, tales como entre aproximadamente 2000 y aproximadamente 20 000).

Un agente terapéutico u otro distinto pueden conjugarse bien directa o indirectamente a un anticuerpo específico de
 10 CD74 de la presente invención, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Un ejemplo de conjugación indirecta de un segundo agente es a través de un resto espaciador a restos de cisteína o de lisina en el anticuerpo. El resto terapéutico u otro distinto pueden además o alternativamente conjugarse a un resto N (amino) terminal o C (carboxi) terminal de un polipéptido de anticuerpo específico de CD74 o fragmento del mismo (por ejemplo, una
 15 cadena H o L de un anticuerpo específico de CD74) (véase, por ejemplo, Antibody Engineering Handbook, editado por Osamu Kanemitsu, publicado por Chijin Shokan (1994)). Los derivados de anticuerpo conjugados también pueden generarse por conjugación en restos internos o azúcares, donde sea apropiado. Los métodos ejemplares también se describen, por ejemplo, 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).

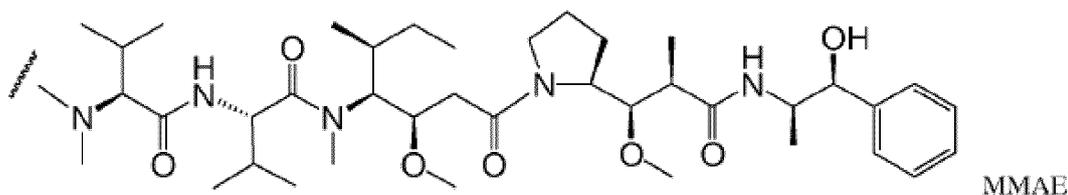
En una realización, un anticuerpo específico de CD74 se conjuga a una molécula de profármaco a través de un
 20 espaciador o conector que puede activarse *in vivo* a un fármaco terapéutico. Por ejemplo, el resto de profármaco puede fijarse al anticuerpo a través de un conector, a través del N o el C terminal del resto de fármaco peptídico o no peptídico. Después de la administración, los espaciadores o conectores se escinden por enzimas asociadas a
 25 células tumorales u otras condiciones específicas de tumor, por lo que el fármaco activo se forma. Los ejemplos de dichas tecnologías y conectores de profármacos se describen en los documentos WO02083180, WO2004043493, WO2007018431, WO2007089149, WO2009017394 y WO201062171 por Syntarga BV, *et al.* La tecnología de anticuerpo-profármaco y los análogos de duocarmicina adecuados pueden encontrarse también en la Patente de EE.UU. N.º 6.989.452 (Medarex). La tecnología de profármaco adecuada para auristatínas se describe en el
 30 documento WO03026577 (Seattle Genetics) y otras referencias a auristatina mencionadas anteriormente.

En una realización, un anticuerpo específico de CD74 se conjuga a un resto terapéutico o un profármaco a través de
 un conector sensible a cambios en el pH o condiciones reductoras. Las tecnologías de conector adecuadas se
 35 conocen en la materia e incluyen aquellas descritas, por ejemplo, en Ducry, L y Stump, Bioconjugate Chem. 2010; 21:5-13; Senter P. D., Current Opinion in Chemical Biology 2009; 13:235-244; y Carter, P. J. y Senter, P. D., The Cancer Journal 2010; 14:154-169.

En algunas realizaciones, el conector es escindible en condiciones intracelulares, de tal manera que la escisión del
 40 conector libera la unidad de fármaco del anticuerpo en el ambiente intracelular. En algunas realizaciones, el conector es escindible por un agente escindible que está presente en el ambiente intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveolo). El conector puede ser, por ejemplo, un conector peptídico que se escinde por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo, pero no limitado a, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunas realizaciones, el conector peptídico tiene 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
 45 hidrolizan derivados de fármacos dipeptídicos dando como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). En una realización específica, el conector peptídico escindible por una proteasa intracelular es un conector Val-Cit (valina-citrulina) o un conector Phe-Lys (fenilalanina-lisina) (véase, por ejemplo, el documento US6214345, que describe la síntesis de doxorubicina con el conector Val-Cit y diferentes ejemplos de conectores Phe-Lys). Los ejemplos de las estructuras de un conector Val-Cit y uno Phe-Lys incluyen pero no se limitan a MC-vc-PAB descritos a continuación, MC-vc-
 50 GABA, MC-Phe-Lys-PAB o MC-Phe-Lys-GABA, en donde MC o mc es una abreviatura de caproil maleimido, vc es una abreviatura de Val-Cit, PÂB es una abreviatura de *p*-aminobencilcarbamatato y GABA es una abreviatura de ácido γ -aminobutírico. Una ventaja de usar la 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.

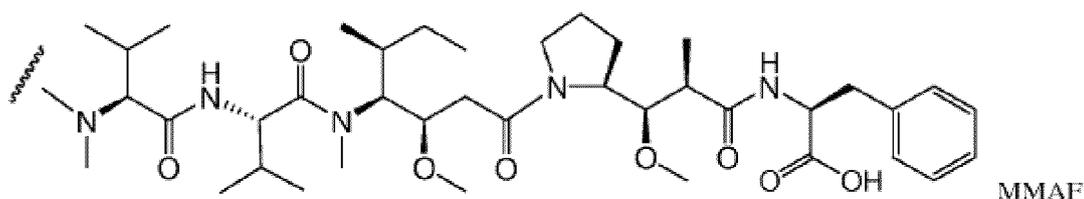
En aún otra realización, la unidad conectora no es escindible y el fármaco se libera por degradación del anticuerpo
 (véase, por ejemplo, el documento US 2005/0238649). Típicamente, dicho conector no es sustancialmente sensible
 60 al ambiente extracelular. Como se usa en el presente documento, "no sustancialmente sensible al ambiente extracelular" en el contexto de un conector significa que no más del 20 %, típicamente no más de aproximadamente el 15 %, más típicamente no más de aproximadamente el 10 % e incluso más típicamente no más de aproximadamente el 5 %, no más de aproximadamente el 3 % o no más de aproximadamente el 1 % de los conectores, en una muestra de compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco, se escinden cuando el compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco se presenta en un ambiente extracelular (por ejemplo, el plasma).

En una realización específica, el anticuerpo específico de CD74 se conjuga a MMAE (fórmula I):



en donde la línea ondulada indica el sitio de unión covalente para el conector.

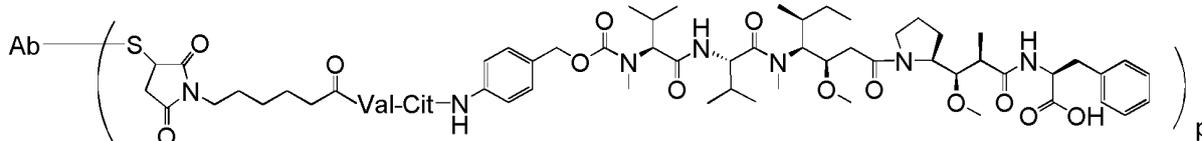
- 5 En otra realización específica, el anticuerpo específico de CD74 se conjuga a MMAFE (fórmula II):



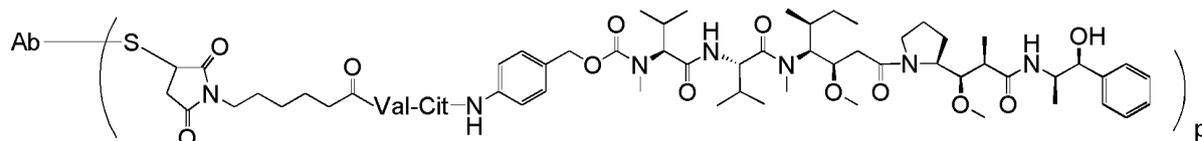
- 10 en donde la línea ondulada indica el sitio de unión covalente para el conector.

En una realización particular, el conector a MMAE o MMAF se fija a grupos sulfhidrido (restos cisteína libres) del anticuerpo específico CD74, obtenido por una reducción (parcial) del anticuerpo específico de CD74.

- 15 En otra realización particular, el conector-auristatina es MC-vc-PAB-MMAF (también designado vcMMAF) o MC-vc-PAB-MMAE (también designado vcMMAE (fórmula III y IV, respectivamente)):



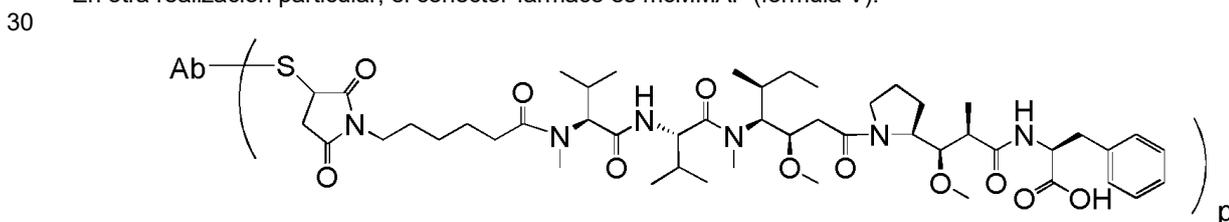
Ab-MC-vc-PAB-MMAF (vcMMAF)



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

en donde p denota un número de 1 a 8, S representa un resto tiol de cisteína libre del anticuerpo específico de CD74 y Ab designa el anticuerpo específico de cD74. En una realización de los mismos, el conector-auristatina es vcMMAE. El resto conector de fármaco 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 conector de fármaco vcMMAE puede unirse a los anticuerpos específicos de CD74 en las cisteínas usando un método similar a aquellos descritos en esos documentos.

- 25 En otra realización particular, el conector-fármaco es mcMMAF (fórmula V):



Ab-MC-MMAF (mcMMAF)

en donde p denota un número de 1 a 8, S representa un resto tiol de cisteína libre del anticuerpo específico de CD74

y Ab designa el anticuerpo específico de cD74. El resto conector de fármaco mcMMAF y los métodos de conjugación se desvelan en los documentos US7498298, US 11/833.954, and WO2005081711 (Seattle Genetics, Inc.) y el resto conector de fármaco mcMMAF puede unirse a los anticuerpos específicos de CD74 en las cisteínas usando un método similar a aquellos descritos en esos documentos.

5 En un aspecto, la invención proporciona un ADC específico de CD74 que comprende un anticuerpo que se une al mismo epítipo que un anticuerpo seleccionado de 005, 006 y 011, y un fármaco que es auristatina o un análogo, derivado o profármaco del mismo. En una realización, la CE_{50} del ADC en la unión al dominio extracelular de CD47v1 es menor que aproximadamente 0,2 $\mu\text{g/ml}$, tal como menor que 0,1 $\mu\text{g/ml}$, o menor que aproximadamente 10 0,05 $\mu\text{g/ml}$, opcionalmente más alto que 0,01 $\mu\text{g/ml}$, tal como más alto que 0,02 $\mu\text{g/ml}$, cuando se determina en un ensayo como se describe en el Ejemplo 16. En una realización, el ADC específico de CD74 induce una muerte celular más alta que un 70 %, un 80 % o un 90 % cuando se mide para células Raji, Daudi o M4A4 en un ensayo como se describe en el Ejemplo 18. En una realización, el ADC específico de CD74 tiene una CI_{50} de menos que aproximadamente 0,5 $\mu\text{g/ml}$, menos que aproximadamente 0,3 $\mu\text{g/ml}$, menos que aproximadamente 0,2 $\mu\text{g/ml}$, o 15 menos que aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$, y opcionalmente más alto que 0,005 $\mu\text{g/ml}$ o aproximadamente 0,01 $\mu\text{g/ml}$, induciendo la muerte de células Raji, Daudi o M4A4 cuando se determina en un ensayo como se describe en el Ejemplo 18. En una realización, el anticuerpo comprende las VH CDR1, 2 y 3 y VL CDR1, 2 y 3 de 005, descritas en la Tabla 3. En una realización, el anticuerpo comprende las VH CDR1, 2 y 3 and VL CDR1, 2 y 3 de 006, descritas en la Tabla 3. En una realización, el anticuerpo comprende las VH CDR1, 2 y 3 and VL CDR1, 2 y 3 de 011, 20 descritas en la Tabla 3. En una realización, el fármaco es un derivado de monometil auristatina, opcionalmente seleccionada de MMAE y MMAF.

En un aspecto, la invención proporciona un ADC específico de CD74 que comprende las secuencias VH y VL de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en 005, 006 y 011 y un fármaco seleccionado de MMAE y MMAF. 25 En una realización, el anticuerpo es 005. En una realización, el anticuerpo es 006. En una realización, el anticuerpo es 011. En una realización particular, el anticuerpo es 005 y el fármaco es MMAE, opcionalmente vcMMAE. En una realización particular, el anticuerpo es 005 y el fármaco es MMAF, opcionalmente mcMMAF. En una realización particular, el anticuerpo es 006 y el fármaco es MMAE, opcionalmente vcMMAE. En una realización particular, el anticuerpo es 006 y el fármaco es MMAF, opcionalmente mcMMAF. En una realización particular, el anticuerpo es 30 011 y el fármaco es MMAE, opcionalmente vcMMAE. En una realización particular, el anticuerpo es 011 y el fármaco es MMAF, opcionalmente mcMMAF.

En realizaciones específicas y separadas, la invención proporciona los siguientes ADC específicos de CD74: 011-vcMMAE, 006-vcMMAE, 005-vcMMAE, 011-mcMMAF, 006-mcMMAF y 005-mcMMAF. 35

La carga de fármaco citostático se representa por p y es el número promedio de restos de fármaco citostático por anticuerpo en una molécula (también designada la relación fármaco a anticuerpo, DAR, por sus siglas en inglés). La carga de fármaco citostático puede variar de 1 a 20 restos de fármaco por anticuerpo y puede ocurrir en aminoácidos con grupos funcionales útiles tales como, pero no limitados a, grupos amino o sulfhidrilo, como en la lisina o la cisteína. 40

Dependiendo del modo de conjugación, p puede limitarse por el número de sitios de fijación en el anticuerpo, por ejemplo cuando la fijación es un tiol de cisteína, es decir, un grupo sulfhidrilo. Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos, es decir, grupos sulfhidrilo, que pueden conectarse a un resto de fármaco, ya que la mayoría de los restos tiol de cisteína en los anticuerpos existen como puentes disulfuro. 45 Por lo tanto, en ciertas realizaciones, un anticuerpo puede reducirse con un agente reductor tal como ditiotreitil (DTT) o tricarboniletilfosfina (TCEP), en condiciones parcial o completamente reductoras, para generar grupos sulfhidrilo reactivos. En ciertas realizaciones, la carga de fármaco para un ADC de la invención varía de 1 a aproximadamente 8, tales como de aproximadamente 2 a 5, tales como aproximadamente 3 a 5, tales como 50 aproximadamente 4. Un máximo de 8 grupos sulfhidrilo libres puede volverse disponible después de la reducción (parcial) del anticuerpo (hay 8 cisteínas implicadas en la unión disulfuro intra-catenaria).

Construcciones de expresión

55 En aspectos adicionales y separados, la invención se refiere a vectores de expresión que codifican las secuencias de un anticuerpo de la invención, a las células hospedadoras que comprenden dichos vectores de expresión, a hibridomas que producen anticuerpos de la invención y a métodos para producir un anticuerpo de la invención cultivando dichas células hospedadoras o hibridomas en condiciones apropiadas por las que se produce el anticuerpo y, opcionalmente, se recupera. 60

En una realización, el vector de expresión comprende una o más secuencias de nucleótidos que codifican una o más de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 11, 19, 23 y 26 o cualquier combinación de las mismas. En otra realización, el vector de expresión comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos V_L seleccionada de SEQ ID NO: 23 y 26. En otra realización, 65 el vector de expresión comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la cadena ligera de anticuerpo humano, de la cadena pesada de anticuerpo humano o ambas.

Un vector de expresión en el contexto de la presente invención puede ser cualquier vector adecuado, incluyendo vectores cromosómicos, no cromosómicos y de ácidos nucleicos sintéticos (una secuencia de ácidos nucleicos 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 fagos, baculovirus, plásmidos de levaduras, vectores
5 derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos y vectores de ácidos nucleicos víricos (ARN o ADN). En una realización, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo específico de CD74 está comprendido en un vector de ADN o ARN desnudo, incluyendo, por ejemplo, un elemento de expresión lineal (como se describe por ejemplo en los documentos US 6.077.835 y/o WO 00/70087), un vector plasmídico tales como pBR322, pUC 19/18 o pUC 118/119, un vector de ácido nucleico de tamaño mínimo "enano" (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 por CaPO_4 (como se describe por ejemplo en el documento WO 00/46147, Benvenisty y Reshef, PNAS EE.UU 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., Cell 14, 725 (1978) y Coraro y Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)). Dichos vectores de ácidos nucleicos y el uso de los mismos se conocen bien en la materia (véanse por ejemplo los documentos US 5.589.466 y US 5.973.972).

En una realización, el vector es adecuado para la expresión del anticuerpo específico de CD74 en una célula bacteriana. Los ejemplos de dichos vectores incluyen los vectores de expresión tales como BlueScript (Stratagene), vectores pIN (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)), vectores pET (Novagen, Madison WI) y similares.

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

Un ácido nucleico y/o un vector también puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de secreción/localización, que puede marcar como diana un polipéptido, tales como una cadena polipeptídica nascente, al espacio periplásmico o en un medio de cultivo celular. Dichas secuencias se conocen en la materia e incluyen péptidos líder o señal de secreción, secuencias dirigidas a orgánulos (por ejemplo, secuencias de localización nuclear, señales de retención del RE, secuencias de tránsito mitocondrial, secuencias de tránsito de cloroplastos), secuencias de localización/anclaje de membrana (por ejemplo, secuencias de detención de transferencia, secuencias de anclaje GPI) y similares.

En un vector de expresión de la invención, los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos específicos de CD74 pueden comprender o asociarse a un promotor, potenciador adecuados y otros elementos que facilitan la expresión. Los ejemplos de dichos elementos incluyen promotores fuertes de la expresión (por ejemplo, promotor/potenciador de CMV IE humano así como promotores RSV, SV40, SL3-3, MMTV e HIV LTR), secuencias de terminación poli (A) eficaces, un origen de replicación para el producto plasmídico en *E. coli*, un gen de resistencia a antibióticos como un marcador de selección y/o un sitio de clonación adecuado (por ejemplo, un policonector). Los ácidos nucleicos también pueden comprender un promotor inducible en oposición a un promotor constitutivo tales como CMV IE (el experto en la materia reconocerá que dichos términos son realmente descriptores de un grado de expresión génica bajo ciertas condiciones).

En una realización, el vector de expresión que codifica el anticuerpo específico de CD74 se posiciona en y/o se envía a la célula hospedadora o el animal hospedador a través de un vector vírico.

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

En un aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante que produce el anticuerpo de cualquier aspecto o realización descritos en el presente documento. En consecuencia, la invención proporciona una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante, tales como un transfectoma, que produce un anticuerpo o una inmunoglobulina de la invención como se define en el presente documento. Los ejemplos de células hospedadoras incluyen levaduras, células bacterianas y de mamíferos, tales como células CHO o HEK-293. 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 para la expresión de un anticuerpo específico de CD74 de la presente invención. En otra realización, la presente invención proporciona una célula que comprende un ácido nucleico no integrado, tales como un plásmido, un cósmido, un fagémido o un elemento de expresión lineal, que comprende una secuencia que codifica para la expresión de un anticuerpo específico de CD74 de la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un hibridoma que produce un anticuerpo de la invención como se define en el presente documento. En un aspecto incluso adicional, la invención se refiere a un animal no humano o una planta transgénicos que comprenden ácidos nucleicos que codifican una cadena pesada humana y una cadena ligera humana, en donde el animal o la planta producen un anticuerpo de la invención. La generación de dichos

hibridomas y animales o plantas transgénicos se ha descrito anteriormente y se describe adicionalmente en los Ejemplos.

5 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo específico de CD74 de la invención, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) cultivar un hibridoma o una célula hospedadora de la invención como se describe anteriormente en el presente documento y
- 10 b) recuperar y/o purificar el anticuerpo de la invención del medio de cultivo y, opcionalmente,
- c) preparar un ADC del anticuerpo específico de CD74.

15 En un aspecto adicional, la secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de un anticuerpo de la invención codifica además un segundo resto, tales como un polipéptido terapéutico. Los polipéptidos terapéuticos ejemplares se describen en algún lugar en el presente documento. En una realización, la invención se refiere a un método para producir una proteína de fusión del anticuerpo específico de CD74, comprendiendo dicho método las etapas de

- a) cultivar una célula hospedadora que comprende un vector de expresión que comprende dicha secuencia de nucleótidos y
- 20 b) recuperar y/o purificar la proteína de fusión del anticuerpo específico de CD74 del medio de cultivo.

Composiciones farmacéuticas

25 En un aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un ADC como se define en cualquiera de los aspectos y realizaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables así como cualquier otro adyuvante y excipiente conocidos de acuerdo con técnicas convencionales tales como aquellas descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19a Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995.

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

40 Una composición farmacológica de la presente invención puede incluir además diluyentes, cargas, sales, tampones, detergentes (por ejemplo, un detergente no iónico, tal como Tween-20 o Tween-80), estabilizantes (por ejemplo, azúcares o aminoácidos libres de proteínas), conservantes, fijadores del tejido, solubilizantes y/u otros materiales adecuados para la inclusión en una composición farmacéutica.

45 Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar de tal manera que se obtenga una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, una composición y un modo de administración particulares, sin que sea tóxico para el paciente. El nivel de dosificación adecuado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o la amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular a emplearse, 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 la historia médica anterior del paciente a tratarse y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

50 La composición farmacéutica puede administrarse por cualquier vía y modo adecuados. Las vías adecuadas para administrar un compuesto de la presente invención *in vivo* e *in vitro* se conocen bien en la materia y pueden seleccionarse por aquellos expertos en la materia.

En una realización, una composición farmacéutica de la presente invención se administra parenteralmente.

60 Las frases "administración parenteral" y "parenteralmente administrado" como se usa en el presente documento significan modos de administración distintos de la administración enteral 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.

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

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotonicidad, antioxidantes y agentes de retraso de la absorción adecuados y similares que son fisiológicamente compatibles con un compuesto de la presente invención.

5 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 semillas de algodón y aceite de sésamo, soluciones coloidales de carboximetilcelulosa, goma tragacanto y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y/o diversos tampones. Otros vehículos se conocen bien en las técnicas farmacéuticas.

15 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables o dispersiones estériles. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la materia. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención.

20 La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y por el uso de tensioactivos.

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

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

35 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener además uno o más adyuvantes apropiados para la vía de administración elegida tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes dispersantes, conservantes o tampones, que pueden potenciar la vida útil o la eficacia de la composición farmacéutica. Los compuestos de la presente invención pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Dichos vehículos pueden incluir gelatina, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, polímeros biodegradables biocompatibles tales como acetato de etilen vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poli-orto-ésteres y ácido poliláctico solo o con una cera u otros materiales bien conocidos en la técnica. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones se conocen generalmente por aquellos expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

45 En una realización, los compuestos de la presente invención pueden formularse para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersiones. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la materia. Excepto en la medida en que cualquier medio convencional o agente sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Otros compuestos activos o terapéuticos pueden incorporarse también a las composiciones.

50 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, una micro-emulsión, un liposoma u otras estructuras ordenadas adecuadas para la alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o un 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 oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la 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. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse aproximadamente incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes por ejemplo como

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

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguidos de esterilización por microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los ejemplos de los métodos de preparación son secado al vacío y secado por congelación (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada estéril previamente de la misma.

La composición farmacéutica de la presente invención puede contener un anticuerpo o ADC de la presente invención, una combinación de un anticuerpo o ADC de acuerdo con la invención con otro compuesto terapéutico o una combinación de compuestos de la presente invención.

Aplicaciones terapéuticas

En otro aspecto, la invención se refiere al anticuerpo o el ADC de la invención, como se define en cualquier aspecto o realización de la misma, para su uso como un medicamento.

Los anticuerpos específicos de CD74 de la presente invención pueden usarse en el tratamiento o la prevención de trastornos que implican células que expresan CD74. Por ejemplo, los anticuerpos pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo *in vivo*, para tratar o prevenir trastornos que implican células que expresan CD74. Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" es típicamente un humano que responde al anticuerpo o ADC específicos de CD74. Los sujetos pueden incluir por ejemplo pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o aliviarse modulando la función de CD74 o mediante la muerte de la célula, directa o indirectamente.

En una realización, la invención proporciona un método para modular la señalización asociada a CD74 en una célula que expresa CD74 poniendo en contacto la célula con un anticuerpo específico de CD74. Un anticuerpo específico de CD74 de la invención puede, por ejemplo, interferir con la unión de MIF a CD74, que es un ejemplo no limitante de cómo un anticuerpo de la invención puede modular la señalización asociada a CD74.

En una realización, la invención proporciona un método para matar una célula que expresa CD74 poniendo en contacto la célula con un anticuerpo específico de CD74 de la invención. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la reticulación o la agrupación mediada por anticuerpo (por ejemplo, debido a la región Fc de anticuerpos unidos a CD74 que se unen a células que expresan FcR) de las moléculas de CD74 en la superficie de una célula puede dar lugar a la apoptosis de la célula.

En una realización, la invención proporciona un método para matar una célula que expresa CD74 poniendo en contacto la célula con un anticuerpo específico de CD74 de la invención en presencia de células efectoras capaces de inducir una respuesta celular efectora mediada por Fc tales como una respuesta CDC, ADCC o ADCP. En esta realización, el anticuerpo es típicamente de longitud completa y de un isotipo que da lugar a una respuesta CDC o ADCC, tales como, por ejemplo, un isotipo IgG1,k.

Los anticuerpos específicos de CD74 de la invención se caracterizan por la internalización eficiente tras la unión a CD74, haciéndolos adecuados para un enfoque ADC usando un ADC como se describe en cualquier aspecto o realización descrito en el presente documento.

En consecuencia, en una realización, la invención proporciona un método para matar una célula que expresa CD74 poniendo en contacto la célula con un ADC de la invención que requiere la internalización y el tráfico hacia los lisosomas para la escisión proteolítica específica (es decir, conector escindible) o no específica (conector no escindible) del complejo anticuerpo-conector-fármaco. En otra realización, la invención proporciona un método para matar una célula que expresa CD74 poniendo en contacto la célula con un ADC de la invención en donde el anticuerpo específico de CD74 se conecta a un resto terapéutico a través de un conector permitiendo la liberación del fármaco una vez que el ADC se internaliza, por ejemplo, por un cambio en el pH o en condiciones reductoras. La tecnología de conector adecuada se conoce en la materia, como se describe anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o un ADC específico de CD74 de la presente invención para su uso en los métodos para el tratamiento o la prevención de un trastorno que implica células que expresan CD74 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del

anticuerpo o ADC específico de CD74 a un sujeto en necesidad del mismo. El método implica típicamente administrar a un sujeto un anticuerpo o un ADC específico de CD74 en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el trastorno.

- 5 En un aspecto particular, un anticuerpo o un ADC específico de CD74 se administra profilácticamente para reducir el riesgo de desarrollar cáncer, retrasar la aparición de un evento en el avance del cáncer o reducir el riesgo de reaparición cuando un cáncer está en remisión y/o un tumor primario se ha retirado quirúrgicamente. En el último caso, el anticuerpo específico de CD74 podría, por ejemplo, administrarse asociado a (es decir, antes, durante, o después) la cirugía. La administración profiláctica puede ser útil también en pacientes cuando es difícil localizar un tumor que se cree que está presente debido a otros factores biológicos.

15 Las células que sobreexpresan CD74, tales como las células cancerosas, son dianas particularmente buenas para los anticuerpos o ADC específicos de CD74 de la invención, ya que pueden estar más anticuerpos o ADC unidos por célula. De esta manera, en un aspecto, el trastorno que implica células que expresan CD74 es cáncer, es decir, un trastorno tumorigénico, tales como un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan CD74 incluyendo, por ejemplo, trastornos donde las células son de un tumor sólido o un tumor hematológico. La expresión de CD74 se ha descrito, por ejemplo, en cáncer de mama (Koretz K et al., *Int J Cancer* 1989; 44: 816-822), cáncer colorrectal (Cuthbert RJ et al., *Eur J Cancer* 2009; 45:1654-1663), cáncer endometrial/cervical (Glew SS et al., *Cancer Res* 1992; 52:4009-4016), cáncer gástrico (Tamori Y et al., *Oncol Rep* 2005; 14:873-877), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (SCCHN) (Han J et al., *Head Neck Oncol* 2009; 1:27), cáncer de pulmón (McClelland M et al., *Am J Pathol* 2009; 174:638-646), glioblastoma (Kitange GJ et al., *J Neurooncol* 2010; 100: 177-186), linfoma maligno (Momburg F et al., *Int J Cancer* 1987; 40:598-603), leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) (Narni F et al., *Blood* 1986; 68:372-377), linfoma no Hodgkiniano (NHL), linfoma de células B monocitoides (MBCL) (Stroup R et al., *Hum Pathol* 1992; 23:172-177), leucemia de células peludas (HCL) (Spiro RC et al., *Leuk Res* 1984; 8: 55-62), melanoma maligno (Weeraratna AT et al., *Oncogene* 2004; 23:2264-2274), cáncer de ovario (Rangel LB et al., *Cancer Biol Ther* 2004; 3:1021-1027), cáncer de próstata (Meyer-Siegler KL et al., *BMC Cáncer* 2005; 5:73), cáncer pancreático (Koide N et al., *Clin Cancer Res* 2006; 12:2419-2426), cáncer renal (Saito T et al., *Cancer Lett* 1997; 115:121-127), neoplasmas epiteliales tímicos (Datta MW et al., *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2000; 8:210-215), histiosarcomas fibrosos malignos (Lazova R et al., *Cancer* 1997; 79:2115-2124) y adenomas pituitarios (Rossi ML et al., *Tumori* 1990; 76:543-547). También se ha descubierto que CD74 está regulado positivamente, por ejemplo, en el epitelio gástrico durante la infección por *H. pylori* y la colitis ulcerosa (Beswick, *World J Gastroenterol.* 2009; 15(23):2855-61).

35 Las células ejemplares que expresan CD74 incluyen de esta manera células cancerosas tales como, por ejemplo, células de NHL, mieloma múltiple (MM), cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer gástrico, carcinoma colorrectal y cáncer de hígado.

40 En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o ADC específicos de CD74 de la presente invención para su uso en métodos para tratar o prevenir una neoplasia hematológica, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o ADC específicos de CD74 a un sujeto en necesidad del mismo y en donde la neoplasia hematológica se selecciona de un linfoma, un mieloma y/o una leucemia. En una realización, la neoplasia hematológica se selecciona del grupo que consiste en linfoma maligno, leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), leucemia mielóide crónica (CML) en fase blasto, NHL, MM, MBCL, HCL y linfoma de células T.

45 En una realización, la neoplasia hematológica es NHL. Los anticuerpos y ADC específicos de CD74 de la presente invención pueden, por ejemplo, ser para su uso en el tratamiento tanto de formas indoloras como agresivas de NHL. Los ejemplos de NHL de células B incluyen granulomatosis linfomatoide, linfoma folicular, linfoma de células β grandes difusas, linfoma de células del manto, linfoma de efusión primaria, linfoma de células B grandes intravasculares, linfoma de células B grandes mediestinales, enfermedades de la cadena pesada (incluyendo enfermedad γ , μ y α), linfomas inducidos por terapia con agentes inmunosupresores, tales como linfoma inducido por ciclosporina y linfoma inducido por metotrexato. En una realización, la neoplasia hematológica es mieloma múltiple, tales como, por ejemplo, enfermedad de cadena ligera de mieloma y gammapatía monoclonal de significancia indeterminada (MGUS por sus siglas en inglés). En otras realizaciones separadas y específicas, la neoplasia hematológica es linfoma maligno, B-CLL (tales como, por ejemplo, linfoma linfocítico pequeño; SLL), CML en fase blasto, MBCL o HCL. En una realización, la neoplasia hematológica es un linfoma de linfocitos T, tales como, por ejemplo, micosis fungoide, linfomas de células T periféricas sin especificar, linfoma de células T angioinmunoblásticas, linfoma de células grandes anaplásicas (ALCL), linfoma de células T asociado a enteropatía o linfoma de células T hepatosplénicas. En otra realización, la neoplasia hematológica es linfoma de Hodgkin. En otra realización, la neoplasia hematológica es macroglobulinemia de Waldenstrom. En una realización, la neoplasia hematológica es CLL, tales como B-CLL (por ejemplo, linfoma linfocítico pequeño; SLL).

65 En un aspecto, la presente invención proporciona métodos de un anticuerpo o ADC específico de CD74 de la presente invención para su uso en el tratamiento o la prevención de un tumor sólido, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o ADC específico de CD74 a un sujeto en necesidad del mismo y en donde el tumor sólido es un melanoma, carcinoma, sarcoma, adenoma y/o un glioma. En

una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama (tales como, por ejemplo, cáncer de mama primario o metastásico), cáncer colorrectal, cáncer endometrial/cervical, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello (tales como, por ejemplo, SCCHN), carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón (tales como, por ejemplo, cáncer de pulmón microcítico o cáncer de pulmón no microcítico), glioma maligno (tales como, por ejemplo, astrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme), melanoma maligno (tales como, por ejemplo, melanoma primario metastásico), cáncer de ovario (tales como, por ejemplo, seroso, endometriodé o adenocarcinoma de células transparentes), cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer tímico (tales como, por ejemplo, carcinoma tímico y timoma invasivo), histiosarcoma fibroso maligno, schwannoma acústico, adenoma pituitario y un tumor del tejido blando.

En una realización, el cáncer es cáncer de ovario. En otra realización, el cáncer se selecciona de cáncer de mama primario o metastásico. En otra realización, el cáncer es cáncer pancreático, tales como cáncer pancreático avanzado o metastásico irresecable. En otra realización, el cáncer es cáncer de próstata. En otra realización, el cáncer es cáncer gástrico. En otra realización, el cáncer es carcinoma colorrectal, tales como carcinoma colorrectal metastásico. En otra realización, el cáncer es carcinoma hepatocelular. En otras realizaciones separadas y específicas, el cáncer es cáncer endometrial/cervical, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, glioma maligno, melanoma maligno, cáncer de ovarios, cáncer renal, cáncer tímico, histiosarcoma fibroso maligno, schwannoma acústico, adenoma pituitario o un tumor del tejido blando.

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o ADC específico de CD74 de la presente invención para su uso en métodos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmune, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o ADC específico de CD74 a un sujeto en necesidad del mismo. En una realización, la enfermedad autoinmune se selecciona de una trombocitopenia mediada por el sistema inmune (tales como púrpura trombocitopénica idiopática aguda y púrpura trombocitopénica idiopática crónica), dermatomiositis, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, corea de Sydenham, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, nefritis lupus, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide ampuloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis post-estreptocócica, eritema nudoso, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía de IgA, poliarteritis nudosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangitis obliterans, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, escleroderma, hepatitis activa crónica, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsalis, arteritis de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis de avance rápido y alveolitis fibrosante.

En una realización, la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide. En otra realización, la enfermedad autoinmune es esclerosis sistémica. En otra realización, la enfermedad autoinmune es esclerosis múltiple. En otra realización, la enfermedad autoinmune es enfermedad inflamatoria del intestino, tales como, por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo o ADC específico de CD74 de cualquiera de los aspectos anteriores o realizaciones para su uso en un método de tratamiento de uno cualquiera de los trastornos y realizaciones anteriores mediante la administración a un individuo en necesidad del mismo, del anticuerpo o ADC específico de CD74. La invención también se refiere a anticuerpos o ADC específicos de CD74 de la invención para su uso como un agente terapéutico, por ejemplo, en el tratamiento de cáncer u otro trastorno mencionado en el presente documento.

En una realización la selección de pacientes a tratarse con anticuerpos específicos de CD74 se basa en el nivel de expresión de CD74 en una muestra, tales como una muestra que contiene células tumorales, o detectando tumores que expresan CD74 usando anticuerpos o fragmentos de anticuerpo específicos de CD74 marcados, por ejemplo, aquellos de la invención. Los ensayos diagnósticos para determinar la expresión de CD74 usando anticuerpos o fragmentos de anticuerpo CD74 de la invención se describen en el presente documento.

Las dosificaciones y los regímenes de dosificación eficientes para el anticuerpo o ADC específico de CD74 dependen de la enfermedad o la afección a tratarse y puede determinarse por las personas expertas en la materia.

Un médico que tiene experiencia ordinaria en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico podría empezar dosis del anticuerpo específico de CD74 empleado en la composición farmacéutica a niveles menores que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y gradualmente aumentar la unidad de dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis adecuada de una composición de la presente invención será aquella cantidad del compuesto que es la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico de acuerdo con un régimen de dosificación particular. Dicha dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente.

Por ejemplo, una "cantidad eficaz" para uso terapéutico puede medirse por su capacidad para estabilizar el avance de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer puede, por ejemplo, evaluarse en un sistema predictivo de modelo animal de la efectividad en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una

- composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o inducir citotoxicidad por ensayos *in vitro* conocidos por el médico experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o de otra manera aliviar los síntomas en un sujeto. Un experto ordinario en la materia sería capaz de determinar dichas cantidades basándose en dichos factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o la vía de administración seleccionada.
- Un intervalo ejemplar no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo específico de CD74 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, por ejemplo aproximadamente 0,5 aproximadamente tal como 0,3, aproximadamente 1, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg o aproximadamente 8 mg/kg.
- Un intervalo ejemplar no limitante para una cantidad terapéuticamente eficaz de un ADC específico de CD74 de la invención es 0,02-100 mg/kg, tal como aproximadamente 0,02-30 mg/kg, tal como aproximadamente 0,05-10 mg/kg o 0,1-3 mg/kg, por ejemplo aproximadamente 0,5-2 mg/kg.
- La administración puede ser por ejemplo intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea y por ejemplo se administra próxima al sitio de la diana.
- Los regímenes de dosificación en los métodos e tratamiento y usos anteriores se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un bolo único, pueden administrarse varias dosis divididas durante el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según se indica por las exigencias de la situación terapéutica.
- En una realización, la ventana de efectividad-seguridad se optimiza disminuyendo la toxicidad específica tal como por ejemplo disminuyendo la relación fármaco-anticuerpo (DAR) y/o mezclando el ADC específico de CD74 con anticuerpo específico de CD74 sin marcar.
- En una realización, la efectividad del tratamiento se monitoriza durante la terapia, por ejemplo, en puntos de tiempo predefinidos. En una realización, la efectividad puede monitorizarse midiendo el nivel de CD74 en una muestra que contiene células tumorales, por visualización del área de la enfermedad o por otros métodos diagnósticos descritos además en el presente documento, por ejemplo, realizando uno o más barridos de PET-CT, por ejemplo usando un anticuerpo específico de CD74 marcado, un fragmento o un mini-anticuerpo derivado del anticuerpo específico de CD74 de la presente invención.
- Si se desea, una dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, seis o más sub-dosis administradas separadamente a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente en formas de dosificación unitarias. En otra realización, los anticuerpos específicos de CD74 se administran por infusión continua lenta durante un largo periodo, tal como más de 24 horas, para minimizar cualquier efecto secundario indeseado.
- Aunque es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una composición farmacéutica como se describe anteriormente.
- Una dosis eficaz de un anticuerpo o ADC específico de CD74 de la invención puede administrarse también usando un periodo de dosificación semanal, bisemanal o trisemanal. El periodo de dosificación puede restringirse, por ejemplo, a 8 semanas, 12 semanas o hasta que se haya establecido la progresión clínica.
- Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo o ADC específico de CD74 se administra por infusión en una dosificación semanalmente de entre 10 y 500 mg/m², tal como entre 200 y 400 mg/m². Dicha administración puede repetirse, por ejemplo, 1 a 8 veces, tales como 3 a 5 veces. La administración puede realizarse por infusión continua durante un periodo de 1 a 24 horas, tales como de 1 a 12 horas.
- En otra realización, el anticuerpo o ADC específico de CD74 se administra por infusión cada tres semanas en una dosificación de entre 10 y 500 mg/m², tal como entre 50-200 mg/m². Dicha administración puede repetirse, por ejemplo, 1 a 8 veces, tales como 3 a 5 veces. La administración puede realizarse por infusión continua durante un periodo de 1 a 24 horas, tales como de 1 a 12 horas.
- En una realización, un ADC específico de CD74 se administra como una dosis única de aproximadamente 0,1-10 mg/kg, tales como aproximadamente 1-3 mg/kg, cada semana o cada tercera semana durante hasta doce veces, hasta ocho veces o hasta la progresión clínica. La administración puede realizarse por infusión continua durante un periodo de 1 a 24 horas, tales como de 1 a 12 horas. Dichos regímenes pueden repetirse una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o después de 12 meses. La dosificación puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de compuesto de la presente invención en la sangre tras la administración por ejemplo tomando una muestra biológica y usando anticuerpos anti-idiotípicos que marcan como diana la región de

unión a antígeno de los anticuerpos específicos de CD74 de la presente invención.

En una realización, los anticuerpos específicos de CD74 se administran como terapia de mantenimiento, tales como, por ejemplo, una vez a la semana durante un periodo de seis meses o más.

5 Como ejemplos no limitantes, el tratamiento de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse como una dosificación diaria de un compuesto de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 0,1-100 mg/kg, tales como 0,2, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 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, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, al 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 alternativamente, al menos una de las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 después del inicio del tratamiento o cualquier combinación de los mismos, usando dosis únicas o divididas cada 24, 12, 8, 6, 4 o 2 horas, o cualquier combinación de los mismos.

15 Las composiciones parenterales pueden formularse en una forma de dosificación unitaria para la facilidad de 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 a tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado 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 se dictan por y directamente dependiendo de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a lograrse y (b) las limitaciones inherentes en la materia de realizar compuestos tales como un compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

25 Combinaciones

La invención también proporciona aplicaciones terapéuticas donde un anticuerpo o ADC de la invención es para su uso en combinación con al menos un agente terapéutico adicional relevante para la enfermedad o trastorno a tratarse, como se describe anteriormente. Dicha administración puede ser simultánea, separada o secuencial. Para la administración simultánea los agentes pueden administrarse como una composición o como composiciones separadas, según sea apropiado.

En consecuencia, la presente invención proporciona un anticuerpo o ADC específico de CD74 de la presente invención para su uso en métodos para tratar un trastorno que implica células que expresan CD74 como se describe anteriormente, cuyos métodos comprenden la administración del anticuerpo o ADC específico de CD74 combinados con uno o más agentes terapéuticos adicionales. La presente invención también proporciona el uso de un anticuerpo o ADC específico de CD74 de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica a administrarse con al menos un agente quimioterapéutico para tratar dicho trastorno.

40 El agente terapéutico adicional es típicamente relevante para el trastorno a tratarse. Los agentes terapéuticos ejemplares incluyen otros anticuerpos o ADC anticáncer, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes anti-angiogénicos, inmunógenos anticáncer, agentes de control del ciclo celular/reguladores de la apoptosis, agentes reguladores de hormonas y otros agentes descritos a continuación.

45 En un aspecto, el agente terapéutico adicional es al menos un segundo anticuerpo o ADC que se une a otra diana tales como, por ejemplo, CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD19, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD52, CD54, CD80, CD126, B7, MUC1, tenascina, HM1.24 o HLA-DR. Por ejemplo, el segundo anticuerpo puede unirse a un antígeno de células B, incluyendo, pero no limitado a CD20, CD19, CD21, CD23, CD38, CD46, CD80, CD138, HLA-DR, CD22 o a otro epítipo en CD74. En otra realización, el segundo anticuerpo se une al factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGF-A). En realizaciones separadas y específicas, el agente terapéutico adicional es un anticuerpo específico de CD20 o de CD138.

50 En una realización, el anticuerpo o ADC específico de CD74 de la presente invención es para su uso en combinación con un anticuerpo terapéutico específico, tal como veltuzumab, bevacizumab (Avastin®), zalutumumab, cetuximab (Erbix®), panitumumab Vectibix™, ofatumumab (Arzerra™), ocrelizumab, zanolimumab, daratumumab, ranibizumab (Lucentis®), Zenapax, Simulect, Remicade, Humira, Tysabri, Xolair, raptiva, nimotuzumab, rituximab y/o trastuzumab (Herceptin®). En una realización, el anticuerpo o ADC específico de CD74 de la presente invención se administra en combinación con un anticuerpo específico de CD20 tales como, por ejemplo, veltuzumab, ocrelizumab u ofatumumab (Arzerra™). En otra realización, el anticuerpo o ADC específico de CD74 de la presente invención se administra en combinación con bevacizumab (Avastin®).

60 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo o ADC de cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan CD74, tales como cáncer, en combinación con al menos un agente quimioterapéutico.

65 En una realización, el agente quimioterapéutico se selecciona de un antimetabolito, tal como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, floxuridina (FudR), 3',5'-O-dioleoil-FudR, fludarabina, 5-fluorouracilo,

dacarbazina, hidroxiurea, asparaginasa, gemcitabina, cladribina y agentes similares.

En una realización, el agente quimioterapéutico se selecciona de un agente alquilante, tales como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozocina, dacarbazina (DTIC), procarbacin, mitomicina C y un derivado de platino tal como cisplatina, carboplatina y agentes similares.

En una realización, el agente quimioterapéutico se selecciona de un agente antimitótico, tales como taxanos, por ejemplo docetaxel y paclitaxel y alcaloides vinca, por ejemplo vindesina, vincristina, vinblastina y vinorelbina.

En una realización, el agente quimioterapéutico se selecciona de un inhibidor de la topoisomerasa, tales como topotecano o irinotecano.

En una realización, el agente quimioterapéutico se selecciona de un fármaco citostático, tales como etopósido y tenipósido.

En una realización, el agente quimioterapéutico se selecciona de un inhibidor del receptor del factor de crecimiento; tales como un inhibidor de ErbB1 (EGFR) (tales como Iressa, erbitux (cetuximab), tarceva y agentes similares), un inhibidor de ErbB2 (Her2/neu) (tales como herceptina y agentes similares) y agentes similares.

En una realización, el agente quimioterapéutico se selecciona de un inhibidor de la tirosina quinasa, tales como imatinib (Glivec, Gleevec ST1571), lapatinib, PTK787/ZK222584 y agentes similares.

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o ADC específico de CD74 de la presente invención para su uso en un método para tratar un trastorno que implica células que expresan CD74 en un sujeto, tales como un paciente de cáncer, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o ADC específico de CD74 y al menos un inhibidor de la angiogénesis, la neovascularización y/u otras vascularizaciones a un sujeto en necesidad del mismo.

Los ejemplos de dichos inhibidores de la angiogénesis son inhibidores de la uroquinasa, inhibidores de la metaloproteasa de matriz (tales como marimastat, neovastat, BAY 12-9566, AG 3340, BMS-275291 y agentes similares), inhibidores de la migración y la proliferación de células endoteliales (tales 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 los factores de crecimiento angiogénico (tales como ZD6474, SU6668, anticuerpos contra agentes angiogénicos y/o sus receptores (tales como VEGF, bFGF y angiopoyetina-1), talidomida, análogos de la talidomida (tales como CC-5013), Sugen 5416, SU5402, ribozima antiangiogénica (tal como angiozima), interferón α (tales como interferón α 2a), suramina y agentes similares), inhibidores de la VEGF-R quinasa y otros inhibidores de tirosina quinasas angiogénicas (tales como SU011248), inhibidores de la señalización de integrinas específicas de endotelio/supervivencia (tales 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 nucleotídicas que inhiben la angiogénesis (tales como ADNc de VEGF antisentido, ADNc que codifica para angiostatina, ADNc que codifica para p53 y ADNc que codifica para el receptor VEGF-2 deficiente) y agentes similares.

Otros ejemplos de dichos inhibidores de la angiogénesis, la neovascularización y/u otras vascularizaciones son derivados de heparina antiangiogénicos y moléculas relacionadas (por ejemplo, heparinasa III), temozolomida, NK4, inhibidores de la ciclooxigenasa-2, inhibidores del factor 1 inducible por hipoxia, isoflavonas de soja antiangiogénicas, oltipraz, fumagilina y análogos de los mismos, análogos de somatostatina, polisulfato de pentosano, tecogalano sódico, dalteparina, tumstatina, trombospondina, NM-3, combrestatina, canstatina, avastina, anticuerpos contra otras dianas relevantes (tales como mAc anti-alfa-v/beta-3 integrina y anti-quinostatina) y agentes similares.

En una realización, el agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo o ADC específico de CD74 para tratar los trastornos como se describen anteriormente es un inmunógeno anticáncer, tales como un antígeno de cáncer/antígeno asociado al tumor (por ejemplo, la molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM/TACSTDI), mucina 1 (MUC1), antígeno carcinoembrionario (CEA), glucoproteína 72 asociada al tumor (TAG-72), gp100, Melan-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, vacunas víricas asociadas a cáncer (por ejemplo, vacunas del virus del papiloma humano), proteínas de choque térmico derivadas del tumor y agentes similares. Un número de otros antígenos de cáncer/antígenos asociados al tumor adecuados conocidos en la técnica pueden usarse también o alternativamente en dicha realización. Los péptidos inmunogénicos anticáncer también incluyen "vacunas" anti-idiotípicas tales como anticuerpos anti-idiotípicos BEC2 (Mitumomab), CeaVac y anticuerpos anti-idiotípicos relacionados, anticuerpo anti-idiotípico al anticuerpo MG7 y otros anticuerpos anti-idiotípicos anticáncer (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 anticuerpos anti-idiotípicos pueden conjugarse

opcionalmente a un vehículo, que puede ser un vehículo de molécula sintética (típicamente inerte), una proteína (por ejemplo hemocianina de lapa ojo de cerradura (KLH) (véase por ejemplo Ochi et al., Eur J Immunol. 17(11), 1645-8 (1987)), o una célula (por ejemplo un eritrocito - véase por ejemplo Wi et al., J Immunol Methods. 122(2), 227-34 (1989)).

5 En una realización, el agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo o ADC específico de CD74 para tratar los trastornos como se describe anteriormente es una citocina, quimiocina o combinación de citocina/quimiocina con propiedades inhibitorias del crecimiento del cáncer. Los ejemplos de citocinas y factores de crecimiento adecuados incluyen IFN γ , 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 α (por ejemplo, IFN α 2 β), IFN β , GM-CSF, CD40L, ligando Flt3, factor de células madre, anacim y TNF α . Las quimiocinas adecuadas pueden incluir quimiocinas negativas Glu-Leu-Arg (ELR) tales como IP-10, MCP-3, MIG y SDF-1 α de las familias de quimiocinas CXC y C-C humanas. Las citocinas adecuadas incluyen derivados de citocina, variantes de citocina, fragmentos de citocina y proteínas de fusión de citocina. Estos y otros métodos o usos que implican ácidos nucleicos que codifican péptidos de origen natural en el presente documento pueden realizarse alternativa o adicionalmente por "activación génica" y técnicas de regulación positiva de genes de recombinación homólogos, tales como aquellos descritos en los documentos US 5.968.502, US 6.063.630 y US 6.187.305 y EP 0505500.

20 En una realización, el agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo o ADC específico de CD74 para tratar los trastornos como se describen en el presente documento puede ser un regulador del control del ciclo celular/apoptosis (o "agente regulador"). Un regulador del control del ciclo celular/apoptosis puede incluir moléculas que marcan como diana y modulan reguladores del control del ciclo celular/apoptosis tales como (i) cdc-25 (tales como NSC 663284), (ii) quinasas dependientes de ciclina que sobreestiman el ciclo celular (tales como flavopiridol (L868275, HMR1275), 7-hidroxi-estaurosporina (UCN-01, KW-2401) y roscovitina (R-roscovitina, CYC202)) y (iii) moduladores de la 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 las rutas apoptóticas incluyen ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL)/ligando apoptosis-2 (Apo-2L), anticuerpos que activan los receptores TRAIL, IFN y Bcl-2 antisentido.

30 En una realización, el agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo o ADC específico de CD74 para el tratamiento de los trastornos como se describen anteriormente es un agente regulador hormonal, tales como agentes útiles para la terapia anti-andrógenos y anti-estrógenos. Los ejemplos de dichos agentes de regulación hormonal son tamoxifeno, idoxifeno, fulvestrant, droloxifeno, toremifeno, raloxifeno, dietilestilbestrol, etinil estradiol/etinilo, un anti-andrógeno (tal como flutamida/eulexina), una progestina (tales como caproato de hidroxiprogesterona, medroxiprogesterona/provera, macepato de megesterol/mace), un adrenocorticosteroide (tales como hidrocortisona, prednisona), hormona liberadora de la hormona luteinizante (y análogos de los mismos y otros agonistas de la LHRH tales como buserelina y goserelina), un inhibidor de la aromatasas (tales como anastrozol/arimidex, aminoglutetimida/citradeno, exemestano), un inhibidor hormonal (tales como octreótido/sandostatina) y agentes similares.

40 En una realización, el agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo o ADC específico de CD74 para tratar los trastornos como se describe anteriormente es un agente anti-anérgico (por ejemplo compuestos de moléculas pequeñas, proteínas, glucoproteínas o anticuerpos que rompen la tolerancia a antígenos del tumor y de cáncer). Los ejemplos de dichos compuestos son moléculas que bloquean la actividad de CTLA-4, tales como MDX-010 (ipilimumab, YervoyTM) (Phan et al., PNAS EE.UU. 100, 8372 (2003)).

50 En una realización, el agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo o ADC específico de CD74 para tratar los trastornos como se describe anteriormente es un ácido nucleico o vector que contiene genes supresores de tumores tales como un adenovirus deficiente en replicación que codifica un p53/SCH58500 de tipo silvestre recombinante humano, etc.; ácidos nucleicos antisentido dirigidos a oncogenes, genes mutados o desregulados; o ARNs dirigidos a oncogenes, genes mutados o desregulados. Los ejemplos de dianas supresoras de tumor incluyen, por ejemplo, BRCA1, RB1, BRCA2, DPC4 (Smad4), MSH2, MLH1 y DCC.

55 En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo o ADC específico de CD74 para tratar los trastornos como se describe anteriormente es un ácido nucleico anticáncer. Los ácidos nucleicos anticáncer ejemplares incluyen genasense (augmerosen/G3139), LY900003 (ISIS 3521), ISIS 2503, OGX-011 (ISIS 112989), LE-AON/LEraf-AON (oligonucleótido antisentido c-raf encapsulado en lisosoma/ISIS-5132), MG98 y otros ácidos nucleicos antisentido que marcan como diana PKC α , clusterina, IGFBP, proteína quinasa A, ciclina D1 o Bcl-2.

60 En una realización, el agente terapéutico para su uso en combinación con un anticuerpo o ADC específico de CD74 para tratar los trastornos como se describe anteriormente es una molécula de ARN inhibitoria anticáncer (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 Suppl), 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 ácidos nucleicos, tales como vacunas de ADN desnudo que codifican dichos antígenos anticáncer/antígenos asociados a tumor (véase por ejemplo los 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 comprenden una composición de vacuna autóloga. En una realización, la composición de combinación y/o el método de administración de combinación comprenden una vacuna de célula entera o de célula que expresa citocinas (por ejemplo un fibroblasto que expresa IL-2 recombinante, una célula dendrítica que expresa citocina recombinante y similares) (véase, por 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.* 2(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 MyVax® (previamente denominado GTOP-99) (Genitope Corporation - Redwood City, CA, EE.UU.).

En una realización, un anticuerpo o un ADC específico de CD74 de acuerdo con la invención se combina o se co-administra con un virus, proteínas víricas o similares. Los virus deficientes en replicación, que generalmente son capaces de solamente unas pocas rondas 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 a ácidos nucleicos que codifican inmunostimulantes, tales como GM-CSF y/o IL-2. Tanto los virus naturalmente oncolíticos como dichos oncolíticos recombinantes (por ejemplo, virus HSV-1, retrovirus, 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 en donde un anticuerpo específico de CD74 se combina o se co-administra con un virus oncolítico. Los ejemplos de dichos virus incluyen adenovirus oncolíticos y virus del herpes, que pueden o pueden no ser 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 enteras" y "adoptiva". Por ejemplo, dichos métodos pueden comprender la infusión o la re-infusión de células del sistema inmune (por ejemplo, linfocitos infiltradores del tumor (TIL, por sus siglas en inglés), tales como células T CD4⁺ y/o CD8⁺ (por ejemplo células T expandidas con antígenos específicos de tumor y/o potenciamientos genéticos), células B que expresan anticuerpos u otras células productoras o presentadoras de anticuerpos, células dendríticas (por ejemplo células dendríticas cultivadas con un agente expansor de DC tales como GM-CSF y/o Flt3-L y/o células dendríticas cargadas con antígeno asociadas a tumor), células NK antitumorales, denominadas células híbridas, o combinaciones de los mismos. Los lisados celulares también pueden ser útiles en dichos métodos y composiciones. Las "vacunas" celulares en pruebas clínicas que pueden ser útiles en dichos aspectos incluyen lisados celulares Canvaxin™, APC-8015 (Dendreon), HSPPC-96 (Antigenics) y Melacine®. Los antígenos derramados de las células cancerosas y las mezclas de los mismos (véase por ejemplo Bystryn et al., *Clinical Cancer Research Vol. 7*, 1882-1887, Julio 2001), opcionalmente mezclados con adyuvantes tales como alumbre, también pueden ser componentes en dichos métodos y composiciones de combinación.

En una realización, un anticuerpo o un ADC específico de CD74 son para su administración a un paciente en combinación con la aplicación de un método de vacunación interna. La vacunación interna se refiere a la muerte celular de tumor o de cáncer inducida, tales como inducida por fármacos o inducida por radiación, muerte celular inducida por crioblación o inducida por ablación de radiofrecuencia de las células tumorales, en un paciente, que típicamente da lugar a la provocación de una respuesta inmune dirigida hacia (i) las células tumorales como un todo o (ii) partes de las células del tumor incluyendo (a) proteínas secretadas, glucoproteínas u otros productos, (b) proteínas o glucoproteínas asociadas a membrana u otros componentes asociados a o insertados en las membranas y/o (c) proteínas intracelulares u otros componentes intracelulares. Una respuesta inmune inducida por vacunación interna puede ser humoral (es decir, mediada por anticuerpo-complemento) o mediada por células (por ejemplo, el desarrollo y/o el aumento de linfocitos T citotóxicos endógenos que reconocen las células tumorales muertas internamente o partes de las mismas). Además de la radioterapia, los ejemplos no limitantes de fármacos y agentes que pueden usarse para inducir dicha muerte celular de tumor y vacunación interna son agentes quimioterapéuticos convencionales, inhibidores del ciclo celular, fármacos anti-angiogénesis, anticuerpos monoclonales, agentes inductores de la apoptosis e inhibidores de la señal de transducción.

Los ejemplos de otros agentes anti-cáncer, que pueden ser relevantes como los agentes terapéuticos para su uso en combinación con un anticuerpo o ADC específico de CD74 para tratar los trastornos como se describe anteriormente son agentes de inducción de diferenciación, análogos del ácido retinoico (tales como ácido retinoico todo trans, ácido retinoico 13-cis y agentes similares), análogos de la vitamina D (tales como seocalcitol y agentes similares), inhibidores de ErbB3, ErbB4, IGF-1R, receptor de insulina, PDGFRalfa, PDGFRbeta, Flk2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TRKA, TRKC, c-met, Ron, Sea, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Alk, LTK, PTK7 y agentes similares.

Los ejemplos de otros agentes anti-cáncer, que pueden ser relevantes como los agentes terapéuticos para su uso en combinación con un anticuerpo o ADC específico de CD74 para tratar los trastornos como se describe anteriormente son catepsina B, moduladores de la actividad deshidrogenasa de catepsina D, glutatión-S-transferasa (tales como glucatilcisteína sintetasa y lactato deshidrogenasa) y agentes similares.

5 Los ejemplos de otros agentes anti-cáncer, que pueden ser relevantes como los agentes terapéuticos para su uso en combinación con un anticuerpo específico de CD74 para tratar los trastornos como se describe anteriormente son estramustina y epirubicina.

10 Los ejemplos de otros agentes anti-cáncer, que pueden ser relevantes como los agentes terapéuticos para su uso en combinación con un anticuerpo específico de CD74 para tratar los trastornos como se describe anteriormente son inhibidores de HSP90 tales como 17-(Alilamino)-17-desmetoxigeldanamicina, anticuerpos dirigidos contra un antígeno tumoral tales como PSA, CA125, KSA, etc., integrinas como integrina $\beta 1$, inhibidores de VCAM y agentes similares.

15 Los ejemplos de otros agentes anti-cáncer, que pueden ser relevantes como los agentes terapéuticos para su uso en combinación con un anticuerpo o ADC específico de CD74 para tratar los trastornos como se describe anteriormente son inhibidores de calcineurina (tales como valsopodar, PSC 833 y otros MDR-1 o inhibidores de p-glucoproteína), inhibidores TOR (tales como sirolimo, everolimo y rapamicina) e inhibidores de los mecanismos de "migración dirigida de los linfocitos" (tales como FTY720) y agentes con efectos en la señalización celular tales como inhibidores de la molécula de adhesión (por ejemplo anti-LFA, etc.).

20 En una realización, puede administrarse un anticuerpo o ADC específico de CD74 puede administrarse junto con la administración de uno o más agentes que promuevan el acceso del anticuerpo específico de CD74 o una composición de combinación al interior de un tumor. Dichos métodos pueden realizarse por ejemplo en asociación con la administración de una relaxina, que es capaz de relajar un tumor (véase por ejemplo el documento US 6.719.977). En una realización, un anticuerpo o ADC específico de CD74 de la presente invención puede unirse a un péptido penetrador de células (CPP). Los péptidos penetradores de células y péptidos relacionados (tales como anticuerpos penetradores de células diseñados por ingeniería) 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. 30 12(1), 67-77 (1998) y Tseng et al., Mol Pharmacol. 62(4), 864-72 (2002).

En aún otra realización, el anticuerpo o ADC específico de CD74 se administra junto con un agente de regulación positiva de CD74, tales como, por ejemplo, IFN γ o *H. pylori* inactivada.

35 En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar un trastorno que implica células que expresan CD74 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o ADC específico de CD74 y al menos un agente antiinflamatorio, inmunosupresor y/o inmunomodulador a un sujeto en necesidad del mismo.

40 En una realización un agente antiinflamatorio tal puede seleccionarse de aspirina y otros salicilatos, inhibidores de Cox-2 (tales como rofecoxib y celecoxib), AINE (tales como ibuprofeno, fenoprofeno, naproxeno, sulindaco, diclofenaco, piroxicam, cetoprofeno, diflunisal, nabumetona, etodolaco, oxaprozina e indometacina), anticuerpos anti-IL-6R, anticuerpos anti-IL-8 (por ejemplo, anticuerpos descritos en el documento WO2004058797, tales como 10F8), anticuerpos anti-IL-15 (por ejemplo, anticuerpos descritos en el documento WO03017935 y WO2004076620), Ac anti-receptor de IL-15, anticuerpos anti-CD4 (por ejemplo, zanolimumab), anticuerpos anti-CD11a (por ejemplo, efalizumab), anticuerpos anti-alfa-4/beta-1 integrina (VLA4) (por ejemplo, natalizumab), CTLA4-Ig para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, prednisolona, prednisona, fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD, por sus siglas en inglés) tales como metotrexato, hidroxiclorocina, sulfasalacina, inhibidores de la síntesis de pirimidina (tales como leflunomida), agentes bloqueantes del receptor IL-1 (tales como anakinra), agentes bloqueantes de TNF- α (tales como etanercept, infliximab y adalimumab) y agentes similares.

50 En una realización, dicho agente inmunosupresor y/o inmunomodulador puede seleccionarse de ciclosporina, azatioprina, ácido micofenólico, mofeetil micofenolato, corticosteroides tales como prednisona, metotrexato, sales de oro, sulfasalazina, antimaláricos, brequinar, leflunomida, mizoribina, 15-desoxiespergualina, 6-mercaptapurina, ciclofosfamida, rapamicina, tacrolimo (FK-506), timopentina, timosina-o y agentes similares.

60 En una realización, dicho agente inmunosupresor y/o inmunomodulador puede seleccionarse de Ac inmunosupresores, tales como anticuerpos que se unen a p75 del receptor IL-2, anticuerpos contra CD25 (por ejemplo, aquellos descritos en el documento WO2004045512, tales como AB1, AB7, AB11 y AB12), anticuerpos contra la globulina de timocitos o anticuerpos que se unen por ejemplo a MHC, CD2, CD3 (tales como, por ejemplo, OKT3), CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6R, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a o CD58 o anticuerpos que se unen a sus receptor o receptores o ligando o ligandos respectivos.

65 En una realización, dicho agente inmunosupresor y/o inmunomodulador puede seleccionarse de IL-15R soluble, IL-10, moléculas B7 (B7-1, B7-2, variantes de los mismos y fragmentos de los mismos), ICOS y OX40, un inhibidor de

un regulador negativo de células T (tal como un anticuerpo contra CTLA4) y agentes similares.

5 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo o ADC específico de CD74 y un anticuerpo anti-C3b(i) para su uso en un método para el tratamiento de un trastorno que implica células que expresan CD74 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o ADC específico de CD74 y un anticuerpo anti-C3b(i) a un sujeto en necesidad del mismo.

10 En una realización, un agente terapéutico para su uso en combinación con anticuerpos o ADC específicos de CD74 para tratar los trastornos que se describen anteriormente pueden seleccionarse de inhibidores de la 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).

15 Un anticuerpo o ADC específico de CD74 para su uso en el tratamiento de un trastorno como se describe anteriormente que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o ADC específico de CD74 también puede comprender terapia fotodinámica dirigida a anticáncer (por ejemplo, terapia de láser anticáncer - que opcionalmente puede practicarse con el uso de agentes fotosensibilizantes, por ejemplo Zhang et al., J Control Release. 93(2), 141-50 (2003)), terapias de ondas de sonido y ondas de choque anticáncer (véase por ejemplo Kambe et al., Hum Cell. 10(1), 87-94 (1997)), y/o terapia nutracéutica anti-cáncer (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)). Igualmente, un anticuerpo específico de CD74 puede usarse para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un trastorno como se describe anteriormente para administrarse con una terapia fotodinámica dirigida anticáncer (por ejemplo terapia de láser anticáncer - que puede practicarse opcionalmente con el uso de un agente fotosensibilizante), terapias de ondas de sonido y ondas de choque anticáncer y/o terapia nutracéutica anti-cáncer.

25 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo o ADC específico de CD74 de la presente invención para su uso en un método para tratar un trastorno que implica células que expresan CD74 en un sujeto, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o ADC específico de CD74 y radioterapia a un sujeto en necesidad del mismo.

30 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo o ADC específico de CD74 de la presente invención para su uso en un método para tratar o prevenir el cáncer, cuyo método comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o ADC específico de CD74 y radioterapia a un sujeto en necesidad del mismo.

35 En una realización, la presente invención proporciona el uso de un anticuerpo o ADC específico de CD74 de la presente invención, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar cáncer para administrarse en combinación con radioterapia.

40 La radioterapia puede comprender radiación o la administración asociada de productos radiofarmacéuticos a un paciente. La fuente de radiación puede ser bien externa o interna al paciente que se trata (el tratamiento de radiación puede estar, por ejemplo, en forma de terapia de radiación de haz externo (EBRT, por sus siglas en inglés) 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, yoduro-123 e indio-111.

50 En una realización adicional, la presente invención proporciona un anticuerpo o ADC específico de CD74 de la presente invención para su uso en un método para tratar o prevenir cáncer, cuyo método comprende la administración a un sujeto en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o ADC específico de CD74, en combinación con cirugía.

55 Como se describe anteriormente, una composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse en terapia de combinación, es decir, combinada con uno o más agentes relevante para la enfermedad o afección a tratarse bien como composiciones farmacéuticas separadas o con un compuesto de la presente invención co-formulado con uno o más agentes terapéuticos adicionales como se describen anteriormente. Dichas terapias de combinación pueden requerir dosificaciones menores del compuesto de la presente invención y/o los agentes co-administrados, evitando de esta manera posibles toxicidades o complicaciones asociadas a las diversas monoterapias.

60 En una realización, el agente terapéutico adicional para un uso terapéutico particular se selecciona de los siguientes:

- Un anticuerpo específico de CD20, particularmente para el tratamiento de una neoplasia hematológica tal como, por ejemplo, B-CLL o linfoma folicular;
- Un anticuerpo específico de CD138, particularmente para el tratamiento de una neoplasia hematológica tal como, por ejemplo, mieloma;
- Un anticuerpo específico de CD38, particularmente para el tratamiento de una neoplasia hematológica tal como,

por ejemplo, mieloma o CLL;

- Melfalano (o clorhidrato de melfalano) para el tratamiento de una neoplasia hematológica tal como, por ejemplo, mieloma;
- 5 - Un anticuerpo anti-VEGF-A tal como, por ejemplo, bevacizumab, particularmente para el tratamiento de un cáncer tal como, por ejemplo, cáncer de mama;
- Lenalidomida o bortezomib, particularmente para el tratamiento de una neoplasia hematológica tal como, por ejemplo, mieloma;
- Fluorouracilo o gemtacin, particularmente para el tratamiento de un cáncer tal como, por ejemplo, cáncer pancreático;
- 10 - Irinotecano, particularmente para el tratamiento de un cáncer tal como, por ejemplo, cáncer colorrectal y
- Cisplatina u otro derivado de platino, particularmente para el tratamiento de un cáncer tal como, por ejemplo, SCCHN.

Aplicaciones diagnósticas

15 Los anticuerpos específicos de CD74 de la invención pueden usarse también para fines diagnósticos, usando una composición que comprende un anticuerpo específico de CD74 como se describe en el presente documento. En consecuencia, la invención proporciona métodos diagnósticos y composiciones usando los anticuerpos específicos de CD74 descritos en el presente documento. Dichos métodos y composiciones pueden usarse para fines puramente diagnósticos, tales como detección o identificación de una enfermedad que implica células que expresan CD74, así como para monitorizar el progreso de tratamientos terapéuticos, monitorizar el avance de la enfermedad, evaluar el estado después del tratamiento, monitorización para la recurrencia de la enfermedad, evaluación de riesgo de desarrollo de una enfermedad y similares.

25 En un aspecto, los anticuerpos específicos de CD74 de la presente invención se usan *ex vivo*, tales como en diagnosticar una enfermedad en donde las células que expresan CD74 son indicativas de enfermedad o están implicadas en la patogenia, detectando niveles de CD74 o niveles de células que expresan CD74 en su superficie celular en una muestra tomada de un paciente. Esto puede lograrse, por ejemplo, poniendo en contacto la muestra a ensayarse, opcionalmente junto con una muestra control, con el anticuerpo específico de CD74 en condiciones que permitan la unión del anticuerpo a CD74. La formación de complejos puede detectarse después (por ejemplo, usando un ELISA). Cuando se usa una muestra control junto con la muestra de ensayo, el nivel de anticuerpo específico de CD74 o complejo anticuerpo específico de CD74-CD74 se analiza en ambas muestras y un nivel estadísticamente más alto de anticuerpo específico de CD74 o complejo de anticuerpo específico de CD74-CD74 en la muestra de prueba indica un nivel más alto de CD74 en la muestra de ensayo en comparación con la muestra control.

Los ejemplos de inmunoensayos convencionales en donde los anticuerpos específicos de CD74 de la presente invención pueden usarse incluyen, sin limitación, ensayos ELISA, RIA, FACS, ensayos de resonancia de plasmón, ensayos cromatográficos, inmunohistoquímica de tejidos, transferencia Western y/o inmunoprecipitación.

40 En una realización, la invención se refiere a un método para detectar la presencia de un antígeno CD74 o una célula que expresa CD74, en una muestra que comprende:

- poner en contacto la muestra con un anticuerpo específico de CD74 de la invención en condiciones que permitan la unión del anticuerpo específico de CD74 a CD74 en la muestra; y
- 45 - analizar si se ha formado un complejo. Típicamente, la muestra es una muestra biológica.

En una realización, la muestra es una muestra de tejido que se sabe o se sospecha que contiene el antígeno CD74 y/o células que expresan CD74. Por ejemplo, la detección *in situ* de la expresión de CD74 puede lograrse retirando un espécimen histológico de un paciente y proporcionando el anticuerpo de la presente invención a dicho espécimen. El anticuerpo puede proporcionarse aplicando o superponiendo el anticuerpo al espécimen, que se detecta después usando medios adecuados. Es posible después determinar no solamente la presencia de CD74 o células que expresan CD74 sino también la distribución de CD74 o células que expresan CD74 en el tejido examinado (por ejemplo, en el contexto de evaluar la extensión de las células cancerosas). Usando la presente invención, aquellos expertos en la materia percibirán fácilmente que cualquiera de una amplia diversidad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) pueden modificarse para lograr dicha detección *in situ*.

En los ensayos anteriores, el anticuerpo específico de CD74 puede marcarse con una sustancia detectable para permitir que se detecte el anticuerpo unido a CD74. Alternativamente, el anticuerpo específico de CD74 unido (primario) puede detectarse por un anticuerpo secundario que se marca con una sustancia detectable y que se une al anticuerpo primario.

El nivel de CD74 en una muestra puede estimarse también por un inmunoensayo de competición que utiliza patrones de CD74 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo específico de CD74 sin marcar. En este tipo de ensayo, la muestra biológica, el patrón o patrones CD74 marcados y el anticuerpo específico de CD74 se combinan y la cantidad de patrón cD74 marcado unido al anticuerpo específico de CD74 sin marcar se determina. La

cantidad de CD74 en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón CD74 marcado unido al anticuerpo específico de CD74.

5 Las marcas adecuadas para el anticuerpo específico de CD74, el anticuerpo secundario y/o el patrón CD74 usados en técnicas diagnósticas *in vitro* incluyen, sin limitación, diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo y ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de material radiactivo adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S y ^3H .

15 En un aspecto, los anticuerpos específicos de CD74 de la invención se usan en la formación de imágenes *in vivo* de tejidos que expresan CD74 tales como tumores. Para los métodos *in vivo*, los fragmentos de anticuerpo tales como, por ejemplo, fragmentos (Fab')₂, Fab y Fab' son particularmente ventajosos debido a sus rápidas cinéticas de distribución.

20 La formación de imágenes *in vivo* puede realizarse por cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, un anticuerpo específico de CD74 (tal como, por ejemplo, un fragmento) marcado con ^{99}Tc , ^{131}I , ^{111}I u otro isótopo emisor de rayos gamma puede usarse para formar la imagen de la acumulación de anticuerpo específico de CD74 o la distribución en tejidos que expresan CD74 tales como tumores con una cámara de centelleo gamma (por ejemplo, un dispositivo Elscint Apex 409ECT), usando típicamente baja energía, colimador de alta resolución o un colimador de baja energía para todos los fines. Alternativamente, el marcaje con ^{89}Zr , ^{76}Br , ^{18}F u otro radionúclido emisor de positrones puede usarse para formar la imagen de la distribución del anticuerpo o el fragmento de anticuerpo específicos de CD74 en tumores usando tomografía de emisión de positrones (PET). Las imágenes obtenidas por el uso de dichas técnicas pueden usarse para evaluar la biodistribución de CD74 en un paciente, un mamífero o un tejido, por ejemplo en el contexto del uso de CD74 como biomarcador para la presencia de células cancerosas. Las variaciones en esta técnica pueden incluir el uso de formación de imágenes de resonancia magnética (IRM) para mejorar la formación de imágenes sobre técnicas de cámara gamma. Los métodos y los principios de inmunocentelleo convencionales se describen, 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 & Hall 1993). Además, dichas imágenes pueden servir también, o alternativamente, como la base de técnicas quirúrgicas para retirar tumores. Adicionalmente, dichas técnicas de formación de imágenes *in vivo* pueden permitir la identificación y la localización de un tumor en una situación donde un paciente se identifica teniendo 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 rasgos de la presente invención.

40 La formación de imágenes *in vivo* y otros métodos diagnósticos proporcionados por la presente invención son particularmente útiles en la detección de micrometástasis en un paciente humano (por ejemplo, un paciente no diagnosticado previamente con un cáncer o un paciente en un periodo de recuperación/remisión de un cáncer).

45 En una realización, la presente invención proporciona un método de formación de imagen *in vivo* en donde un anticuerpo específico de CD74 de la presente invención se conjuga a un agente radio-opaco promotor de la detección, el anticuerpo conjugado se administra a un hospedador, tal como por inyección en el torrente sanguíneo y se ensaya la presencia y la localización del anticuerpo marcado en el hospedador. A través de esta técnica y cualquier otro método diagnóstico proporcionado en el presente documento, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia de células relacionadas con la enfermedad en un paciente humano o una muestra biológica tomada de un paciente humano y/o para evaluar la distribución del anticuerpo específico de CD74 antes de la terapia de ADC específico de CD74.

50 Para la formación de imagen de diagnóstico, los radioisótopos pueden unirse a un anticuerpo específico de CD74 bien directa o indirectamente usando un grupo funcional intermedio. Los grupos funcionales intermedios incluyen quelantes, tales como ácido etilendiaminotetraacético y ácido dietilentriaminopentaacético (véase por ejemplo el documento US 5.057.313).

60 Además de los radioisótopos y los agentes radio-opacos, los métodos diagnósticos pueden realizarse usando anticuerpos específicos de CD74 que se conjugan a tintes (tales como con el complejo biotina-estreptavidina), agentes de contraste, compuestos o moléculas fluorescentes y agentes de potenciación (por ejemplo, iones paramagnéticos) para formación de imagen por resonancia magnética (IMR) (véase, por ejemplo, la Pat. de EE.UU. N.º 6.331.175, que describe técnicas de RIM y la preparación de anticuerpos conjugados a un agente potenciador de IRM). Dichos agentes diagnósticos/de detección pueden seleccionarse de agentes para su uso en IMR y compuestos fluorescentes. Para cargar un anticuerpo específico de CD74 con metales radiactivos o iones paramagnéticos, puede ser necesario hacerlo reaccionar con un reactivo que tenga una larga cola a la que se fije una multiplicidad de grupos quelantes para unir los iones. Dicha cola puede ser un polímero tal como una polilisina,

un polisacárido u otra cadena derivatizada o derivatizable que tiene grupos colgantes a los que pueden unirse grupos quelantes tales como, por ejemplo, porfirinas, poliaminas, éteres corona, bistiosemicarbazonas, polioximas y grupos similares que se sabe son útiles para este fin. Los quelatos pueden acoplarse a anticuerpos específicos de CD74 usando químicas convencionales.

5 De esta manera, la presente invención proporciona un anticuerpo específico de CD74 diagnóstico, en donde el anticuerpo específico de CD74 se conjuga a un agente de contraste (tal como para la formación de imágenes de resonancia magnética, tomografía computada o un agente de potenciación de contraste de ultrasonidos) o un radionúclido que puede ser, por ejemplo, un isótopo emisor gamma, beta, alfa, de electrones de Auger o de positrones.

10 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un kit para detectar la presencia de un antígeno CD74 o una célula que expresa CD74, en una muestra, que comprende:

- 15 - Un anticuerpo o ADC específico de CD74 de la invención; e
- Instrucciones para el uso del kit.

20 En una realización, la presente invención proporciona un kit para diagnóstico de cáncer que comprende un recipiente que comprende un Ac específico de CD74 y uno o más reactivos para detectar la unión del anticuerpo específico de CD74 a CD74. Los reactivos pueden incluir, por ejemplo, etiquetas fluorescentes, etiquetas enzimáticas u otras etiquetas detectables. Los reactivos también pueden incluir anticuerpos secundarios o terciarios o reactivos para reacciones enzimáticas, en donde las reacciones enzimáticas producen un producto que puede visualizarse. En una realización, la presente invención proporciona un kit diagnóstico que comprende uno o más Ac específicos de CD74, de la presente invención en forma marcada o sin marcar en un recipiente o recipientes adecuados, reactivos para las incubaciones para un ensayo indirecto y sustratos o agentes de derivatización para la detección en un ensayo tal, dependiendo de la naturaleza del marcador. El reactivo o reactivos control y las instrucciones para su uso también pueden incluirse.

30 También pueden suministrarse kits diagnósticos para su uso con un Ac específico de CD74, tales como un Ac específico de CD74 conjugado/marcado, para la detección de la presencia de CD74 en una muestra de tejido o en un hospedador. En dichos kits diagnósticos, así como en los kits para usos terapéuticos descritos en algún lugar en el presente documento, un anticuerpo específico de CD74 puede proporcionarse típicamente en una forma liofilizada en un recipiente, bien solo o junto con anticuerpos adicionales específicos para una célula o un péptido diana. Típicamente, un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, un diluyente inerte) y/o componentes de los mismos, tales como un tampón Tris, fosfato o carbonato, estabilizantes, conservantes, biocidas, proteínas inertes, por ejemplo, seroalbúmina, o similares, también se incluyen (típicamente en un recipiente separado para mezclar) y reactivos adicionales (también típicamente en recipiente o recipientes separados). En ciertos kits, también se incluye un anticuerpo secundario capaz de unirse al Ac específico de CD74, que está típicamente presente en un recipiente separado. El segundo anticuerpo se conjuga típicamente con un marcador y se formula de manera similar al anticuerpo específico de CD74 de la presente invención. Usando los métodos descritos anteriormente y en algún lugar en el presente documento, los anticuerpos específicos de CD74 pueden usarse para definir subconjuntos de células cancerosas/tumorales y caracterizar dichas células y tejidos relacionados con el tumor.

45 Anticuerpos anti-idiotípicos

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo anti-idiotípico que se une a un anticuerpo específico de CD74 de la invención como se describe en el presente documento.

50 Un anticuerpo anti-idiotípico (Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados al sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo anti-Id puede prepararse inmunizando un animal de la misma especie y mismo tipo genético que la fuente de un anticuerpo monoclonal específico de CD74 con el anticuerpo monoclonal al que se está preparando un anti-Id. El animal inmunizado típicamente puede reconocer y responder a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante produciendo un anticuerpo contra estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Dichos anticuerpos se describen por ejemplo en el documento US 4.699.880. Dichos anticuerpos son rasgos adicionales de la presente invención.

60 Un anticuerpo anti-Id también puede usarse como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en aún otro animal, produciendo un denominado anticuerpo anti-anti-Id. Un anticuerpo anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al mAc original, que indujo el anticuerpo anti-Id. De esta manera, usando anticuerpos a los determinantes idiotípicos de mAc, es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica. Los anticuerpos anti-Id pueden ser variados (produciendo de esta manera variantes de anticuerpo anti-Id) y/o derivatizarse por cualquier técnica adecuada, tales como aquellos descritos en algún lugar en el presente documento con respecto a los anticuerpos específicos de CD74 de la presente invención. Por ejemplo, un anticuerpo anti-Id monoclonal puede acoplarse a un vehículo tal como hemocianina de lapa de cerradura (KLH) y usarse para
65 inmunizar ratones BALB/c. Los sueros de estos ratones contendrán típicamente anticuerpos anti-anti-Id que tienen las propiedades de unión similares, si no idénticas, a un anticuerpo específico de CD74 original/parental.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que no deben construirse como limitación adicional.

Ejemplos

5

Ejemplo 1

Construcción de vectores de expresión CD74v1 y -v2, His-CD74v1 y -v2 y CD74del2-36v1 y -v2

10 Las secuencias codificantes para la variante 1 de CD74 humana (CD74v1) (Idéntica a la secuencia de Genbank NP_001020330) y la variante 2 de CD74 humana (VD74v2) (Idéntica a la secuencia de Genbank AAV383110330) se hicieron sintéticamente y se optimizaron en codón completamente (GeneArt, Regensburg, Alemania). Las construcciones se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pEE13.4 (Lonza Biologics, Slough, RU). Estas construcciones se llamaron pEE13.4CD74v1 y pEE13.4CD74v2. Para potenciar el nivel de expresión de CD74 en la superficie celular, la señal de retención del RE citoplasmática (aa2-36) se retiró como se describe (Khalil H et al., J Cell Sci 2005; 118: 4679-4687). Para este fin, se fabricaron nuevas construcciones amplificando las regiones codificantes de CD74 a partir de pEE13.4CD74v1 y pEE13.4CD74v2 y retirando las regiones codificantes aa2-36 en el proceso. Estos fragmentos de PCR se reclonaron en pEE13.4 y se secuenciaron completamente para confirmar que las nuevas construcciones eran correctas. Estos vectores de expresión se llamaron pEE13.4CD74v1del2-36 y pEE13.4CD74v2del2-36.

25 Las regiones codificantes para los dominios celulares de CD74v1 (aa 73-296) y -v2 (aa 73-232) se amplificaron por PCR a partir de pEE13.4CD74v1 y pEE13.4CD74v2, en el proceso introduciendo la región codificante para una etiqueta His hexamérica N terminal. Los fragmentos de PCR se clonaron en un vector de expresión de mamíferos pEE12.4 (Lonza Biologics) que contiene la región codificante de un péptido señal eficiente (HMM38 [Barash S et al., Biochem Biophys Res Commun 2002; 294: 835-842]). Los vectores de expresión se secuenciaron completamente y se llamaron pEE12.4SPHisCD74v1 y pEE12.4SPHisCD74v2. Las proteínas resultantes se llamaron HisCD74v1 e HisCD74v2.

30 Las secuencias de proteínas de variantes de CD74 se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 2

Expresión transitoria en células HEK-293F y en células CHO-S

35 Las células Freestyle™ 293-F (un subclón de HEK-293 adaptado al crecimiento en suspensión y medio químicamente definido Freestyle; HEK-293F) se obtuvieron de Invitrogen y se transfectaron con pEE13.4CD74v1, pEE13.4CD74v2, pEE13.4CD74del2-36v1, pEE13.4CD74del2-36v2, pEE12.4SPHisCD74v1 o pEE12.4SPHisCD74v2, usando 293fectin (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 Los sobrenadantes del cultivo celular, en el caso de pEE12.4SPHisCD74v1 o pEE12.4CD74v2, se recolectaron y se purificaron HisCD74v1 o HisCD74v2 solubles por cromatografía de afinidad de metal, como se describe a continuación.

45 En el caso de pEE13.4CD74v1, pEE13.4CD74v2, pEE13.4CD74v1del2-36 o pEE13.4CD74v2del2-36, las células se recolectaron 1-2 días después de la transfección y se usaron en ensayos posteriores. Estas células se llamaron TH2013-CD74v1, TH2013-CD74v2, TH2013-CD74v1del2-36 y TH2013-CD74v2del2-36.

50 Una línea celular CHO-K1SV adaptada a suspensión (CHO-S, Invitrogen) se transfectó con pEE13.4CD74v1, pEE13.4CD74v2, pEE13.4CD74v1del2-36 o pEE13.4CD74v2del2-36, de acuerdo con el protocolo del fabricante usando el reactivo CHO-Max (Invitrogen). Las células CHO-S transfectadas se cosecharon 1-2 días después de la transfección y se usaron en ensayos posteriores. Estas células se llamaron TC2013-CD74v1, TC2013-CD74v2, TC2013-CD74v1del2-36 y TC2013-CD74v2del2-36.

55 En el caso de la expresión de anticuerpos, los vectores apropiados de cadena pesada y de cadena ligera, como se describen en el Ejemplo 9, se co-expresaron en células HEK-293F como se describe *supra*.

Ejemplo 3

Expresión estable en células NS0

60 El plásmido pEE13.4CD74v1del2-36 se transfectó en células NS0 (Lonza Biologics). Las células se seleccionaron para la integración estable del vector de expresión mediante cultivo en medio de cultivo celular libre de glutamina en presencia de metilsulfoximina (MSX) 25 µM como se describe (Bebbington CR et al., Biotechnology (N Y) 1992; 10:169-175). Las células que expresan CD74 se pusieron en conjunto y se usaron como una población semi-estable o se seleccionaron y se usaron clones individuales estables. Estas células se llamaron N2013del-v1-012.

65

Ejemplo 4**Purificación de CD74 con etiqueta His**

5 HisCD74v1 e HisCD74v2 se expresaron en células HEK-293F. La etiqueta His en las proteínas permite la purificación con cromatografía de afinidad de metal inmovilizado. En este proceso, un quelante fijado en la resina cromatográfica se carga con cationes Co^{2+} . El sobrenadante que contiene CD74ECDHis se incubó con la resina en modo en lotes (es decir, en solución). La proteína con etiqueta His se une fuertemente a las perlas de la resina, mientras que las otras proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo no se unen fuertemente. Después de la
 10 incubación, las perlas se retiran del sobrenadante y se empaquetan en una columna. La columna se lava para retirar las proteínas débilmente unidas. Las proteínas CD74ECDHis fuertemente unidas se eluyen después con un tampón que contiene imidazol, que compite por la unión de His a Co^{2+} . El eluyente se retira de la proteína por intercambio de tampón en una columna de desalación.

Ejemplo 5**Procedimiento de inmunización de ratones transgénicos**

Los anticuerpos HuMab-CD74-005, -006, -008 y -011 derivaron de las inmunizaciones de ratones HCo17 HuMAB
 20 (anticuerpo monoclonal humano; Medarex Inc., San José, CA, EE.UU.) que tienen cuatro modificaciones genéticas. Estos ratones se hicieron transgénicos para la cadena pesada de Ig humana y la ligera kappa de Ig humana y con doble desactivado para los loci de la cadena pesada de ratón y la ligera kappa de ratón. Estas disrupciones previenen la expresión de anticuerpos que sean completamente murinos. Se usaron diferentes cepas; HCo12, HCo12-BALB/c, HCo17 y HCo20. Estas difieren en el número de genes VH (región variable de cadena pesada) y VL
 25 (región variable de cadena ligera) humanos. Los ratones HCo12-BALB/c derivaron por cría cruzada con ratones KCo5-BALB/c (cadena ligera kappa transgénica).

Se usaron seis inmunógenos diferentes para las inmunizaciones: TH2013-CD74v1del2-36, TH2013-CD74v2del2-36, N2013del-v1-012, células SU-DHL-4 (línea celular de linfoma de células B humanas) e HisCD74v1 o HisCD74v2 se
 30 acoplaron a la proteína vehículo KLH (Hemocianina de lapa ojo de cerradura). Los ratones se inmunizaron cada quincena, alternando con 5×10^6 células o con 15 mg de proteína. Se realizaron en total ocho inmunizaciones, cuatro intraperitoneales (IP) y cuatro subcutáneas (SC).

Los anticuerpos -005, -006 y -008 se obtuvieron a partir de la inmunización IP de un ratón HCo17 con 5×10^6 células
 35 TH2013-CD74v1del2-36, alternada con 15 μg de HisCD74v2 SC. La primera inmunización se realizó IP, con las células en adyuvante completo de Freund (CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EE.UU.), las siguientes inmunizaciones en adyuvante incompleto de Freund (IFA) (proteína, SC) o en PBS (células, IP).

El anticuerpo -011 se obtuvo a partir de la inmunización IP de un ratón HCo17 mouse con 5×10^6 células TH2013-
 40 CD74v1del2-36, alternada con 15 μg de HisCD74v1 SC. La primera inmunización se realizó con proteína en CFA (IP), las siguientes inmunizaciones en IFA (proteína, SC) o en PBS (células, IP).

Cuando los títulos de suero se descubrieron ser suficientes (dilución del suero de 1/50 o menor encontrada positiva en un ensayo de detección específico de antígeno como se describe en el Ejemplo 6 en al menos dos eventos
 45 secuenciales, bisemanalmente, de detección) los ratones se potenciaron adicionalmente dos veces de forma intravenosa (IV) con 10 μg de proteína HisCD74 en 100 μl PBS, cuatro y tres días antes de la fusión.

Ejemplo 6**Ensayo de detección específico de antígeno homogéneo**

Los sueros de ratones y los sobrenadantes de hibridoma se analizaron en una detección de alto rendimiento (HTS) *Fluorometric Micro Volume Assay Technology* (ensayo FMAT; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) para la presencia de anticuerpos anti-CD74. En este ensayo, se usaron células TC2013-CD74v1del2-36 y TC2013-
 55 CD74v2del2-36 para detectar anticuerpos anti-CD74 humanos. Se usaron células CHO-S de tipo silvestre para medir la unión no específica. Las muestras se añadieron a las células para permitir que se unieran a CD74. Posteriormente, se detectó la unión de HuMab usando un conjugado fluorescente (anti-IgG-Cy5 humano de cabra; Jackson ImmunoResearch). Los anticuerpos CD74 anti-humanos de ratón (Becton Dickinson; IgG2a, κ ; clon M-B741), marcados con Alexa-647, como se describe a continuación, se usó como un control positivo y chromopure de ratón (Jackson ImmunoResearch) marcado con Alexa-647 se usó como control negativo.
 60

Los anticuerpos se marcaron con el tinte Alexa Fluor® 647 (Molecular Probes), en lo sucesivo en el presente documento "Alexa-647", usando el siguiente procedimiento:
 Se preparó una solución de anticuerpo de IgG 1 mg/ml en tampón carbonato sódico 0,1 M pH 9,0 (NaHCO_3 , Riedel
 65 de Haen, n.º cat. 31437;). Alexa-647 se preparó recientemente, añadiendo 100 μl de DMSO (Sigma, n.º. cat. D2438) y 900 μl de tampón carbonato sódico 0,1 M pH 9,0 a un vial (Alexa Fluor® 647 ácido carboxílico, éster de

succinimidilo (1 mg/vial), Molecular Probes, Leiden, Países Bajos, cat. n.º A-20006). Se añadió un exceso molar de cinco veces de Alexa-647, calculado como se indica a continuación, a la solución de IgG y se incubó, mientras se giraba, en oscuridad a TA durante 1 hora. Después de marcar, se retiró Alexa-647 sin unir, usando una columna PD-10 (Amersham Biosciences, cat. n.º 17-0851-01), con tampón Tris pH 8,0 (50 mM Tris [Trizma base, Sigma, cat. n.º T-6066]; NaCl 100 mM [Riedel de Haen, cat. n.º 31437]; azida sódica al 0,01 % [NaN₃, Riedel de Haen, cat. n.º 13412]). La cantidad de Alexa-647 a añadirse a la solución de IgG se calculó usando la fórmula:

$$\text{Volumen de Alexa-647 a añadirse (en } \mu\text{l)} = (\text{conc IgG (mg/ml)}/\text{MW IgG (Da)} * \text{relación} * \text{volumen} * \text{MW Alexa-647} * 1000.$$

MW IgG = 150 000 Da; la relación es el exceso molar de Alexa-647 a usarse; el volumen es el volumen de la muestra a marcarse (en ml); MW Alexa-647 = 1250 Da.

La concentración de proteína (IgG) y el grado de marcaje (D.O.L.) se determinaron midiendo DO a 280 nm y 650 nm en un Ultrospec 2100 Pro (Amersham Biosciences). La concentración de IgG (mg/ml) se calculó usando la fórmula:

$$\text{Concentración de IgG} = [A_{280} - (0,03 * A_{650})]/\text{coeficiente de extinción de IgG}.$$

D.O.L. se calculó usando la fórmula:

$$\text{D.O.L.} = A_{650}/239\ 000/[A_{280} - (0,03 * A_{650})]/(\text{coeficiente de extinción de IgG} * \text{MW IgG}).$$

239 000 es el coeficiente de extinción de Alexa-647 a λ_{max} en $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$; 0,03 es el factor de corrección (A_{280} tinte libre/ A_{max} tinte libre) (cambios proporcionados por el fabricante). La seroalbúmina bovina (BSA; Sigma, cat. n.º A 2934) se añadió a partir de una solución al 10 % (p/v) a una concentración final de 0,1 % (p/v) y los anticuerpos marcados se almacenaron a 5 °C. En unos pocos barridos de fusión, además del anti-IgG-Cy5.5 humano, para detectar los anticuerpos humanos, se usó un conjugado anti-IgG Cy5.5 marcado de ratón, para detectar anticuerpos quiméricos específicos. Las muestras se detectaron usando un 8200 Cellular Detection System (8200 CDS) de Applied Biosystems y se usó como lectura "recuentos x fluorescencia".

Ejemplo 7

Generación de hibridoma HuMab

Los ratones HuMab con un desarrollo suficiente del título específico de antígeno (como se define anteriormente) se sacrificaron y se recogieron el bazo y los nodos linfáticos que flanquean la aorta abdominal y la vena cava. La fusión de esplenocitos y células del nodo linfático a una línea celular de mieloma de ratón se realizó por electrofusión usando un CEEF 50 Electrofusion System (Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, EE.UU.), esencialmente de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fusionadas se sembraron en medio de fusión que contiene suero Bovino de Clon I Fetal al 10 % (Perbio), piruvato sódico 1 mM (Cambrex), penicilina 0,5 U/ml, estreptomycin 0,5 U/ml (Cambrex), 2-mercaptoetanol 50 μM (Invitrogen), interleucina 6 (IL-6) 600 ng/ml (Strathmann), 1 x HAT (Sigma) y kanamicina 0,5 mg/ml (Invitrogen) en HyQ mADCF-Mab (Perbio). Después de diez días, el sobrenadante se recogió y las células se refrescaron con medio de cosecha, que contenía suero Bovino de Clon I Fetal al 10 %, penicilina 0,5 U/ml, estreptomycin 0,5 U/ml, IL-6 600 ng/ml y 1 x proHT (Cambrex) en HyQ mADCF-Mab. Los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma se detectaron por ensayos de detección FMAT primarios en células TC2013-CD74v1del2-36 y células TC2013-CD74v2del2-36 para detectar hibridomas que producen anticuerpos anti-CD74 humanos (o quiméricos) como se describe *supra*. Los 60 mejores pocillos primarios se sembraron en medio semisólido hecho de 40 % de CloneMedia (Genetix, Hampshire, RU) y 60 % de medio completo HyQ 2x (Hyclone, Waltham, EE.UU.). A partir de cada pocillo primario, se sembraron dos pocillos de una placa de 6 pocillos negra de Genetix. De cada pocillo, se cogieron 33 sub clones, usando el sistema ClonePix (Genetix). Los sub clones se cogieron en medio de siembra. Después de siete días, los sobrenadantes de los sub clones se exploraron de nuevo para la unión de IgG humana específica de CD74 y se midió la concentración de IgG humana usando Octet (Fortebio, Menlo Park, EE.UU.). A partir de cada pocillo primario, el mejor sub clon se expandió en medio de expansión que contenía solamente IL-6 600 ng/ml, penicilina 0,5 U/ml, estreptomycin 0,5 U/ml y 1 x proHT. Los sub clones se expandieron de un pocillo de una placa de 96 pocillos a un pocillo de una placa de 24 pocillos a cuatro pocillos de una placa de 24 pocillos a seis pocillos de placas de 6 pocillos a Hyperflask (producción a pequeña escala). Los sobrenadantes de los hyperflask se exploraron para la unión de IgG humana específica de CD74. Los clones derivados por este proceso se designaron PC2013.

Ejemplo 8

Espectrometría de masas de anticuerpos purificados

Pequeñas alícuotas de 0,8 ml de sobrenadante que contiene anticuerpo de la fase de 6 pocillos o de Hyperflask se purificaron usando columnas PhyTip que contienen resina de proteína G (PhyNexus Inc., San José, EE.UU.) en una estación de trabajo Sciclone ALH 3000 (Caliper Lifesciences, Hopkinton, EE.UU.). Las columnas PhyTip se usaron

de acuerdo con las instrucciones del fabricante pero los tampones se reemplazaron. Se usó PBS (B. Braun, Medical B.V., Oss, Países Bajos) como el Tampón de Unión y Glicina-HCl 0,1 M a pH 2,7 (Fluka Riedel-de Haen, Buchs, Alemania) como Tampón de Elución. Después de la purificación, las muestras se neutralizaron con Tris-HCl 2 M pH 9,0 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). Alternativamente, en algunos casos se purificaron volúmenes más grandes de sobrenadante de cultivo usando cromatografía en columna de afinidad de Proteína A.

Después de la purificación, las muestras se colocaron en una placa de 384 pocillos (Waters, placa de pocillos cuadrados 100 uL, art n.º 186002631). Las muestras se des-glicosilaron con N-glicosidasa F (Roche cat n.º 11365177001) a 37 °C, toda la noche. Se añadió DTT (15 mg/ml) (1 µl/pocillo) y se incubó a 37 °C durante 1 h. Las muestras (5 o 6 µl) se desalaron en un Acquity UPLC™ (Waters, Milford, EE.UU.) con una columna BEH300 C18, 1,7 µm, 2,1x50 mm a 60 °C. Se usaron agua MQ y acetonitrilo de clase CL-EM (Biosolve, cat n.º 01204101, Valkenswaard, Países Bajos), ambos con ácido fórmico al 0,1 % (Fluka, cat n.º 56302, Buchs, Alemania), como Eluyentes A y B. El tiempo de vuelo de los espectros de masas de ionización por electropulverizado se grabaron en línea en un espectrómetro de masas micrOTOF™ (Bruker, Bremen, Alemania) funcionando en el modo ion positivo. Antes del análisis, se calibró una escala 900-3000 m/z con una mezcla ES tuning (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.). Los espectros de masas se descomprimieron con DataAnalysis™ software v3.4 (Bruker) usando la búsqueda de algoritmo de Entropía Máxima para los pesos moleculares entre 5 y 80 kDa.

Después de la descompresión las masas resultantes de cadenas pesadas y ligeras se compararon para encontrar anticuerpos duplicados. En comparación con las cadenas pesadas se tomó 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 en que se encontraran anticuerpos duplicados, se usaron los resultados de otras pruebas para decidir qué material se usó para continuar con los experimentos.

El análisis de espectrometría de masas de los pesos moleculares de las cadenas pesadas y ligeras de 41 hibridomas anti-CD74 produjeron 18 anticuerpos únicos (combinación única de cadena pesada/cadena ligera).

Ejemplo 9

Análisis de secuencias de los dominios variables HuMab específicos de CD74 y clonación en vectores de expresión

El ARN total de los anticuerpos HuMab anti-CD74 se preparó a partir de 5×10^6 células de hibridoma y se preparó ADN complementario (ADNc) 5'-RACE a partir de 100 ng de ARN total, usando el kit de amplificación SMART RACE cDNA (Clontech), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las regiones codificantes V_H (región variable de cadena pesada) y V_L (región variable de cadena ligera) se amplificaron por PCR. Los productos amplificados por PCR de los anticuerpos 006, 008 y 011 se clonaron en el vector pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen) usando el kit de clonación Zero Blunt PCR (Invitrogen).

Los productos de PCR V_H y V_L amplificados del anticuerpo 005 se clonaron en vectores pcDNA3.3 (Invitrogen) que codifican los dominios constantes G1f y Kappa. Para cada HuMab, se secuenciaron 16 clones V_L y 8 clones V_H . Los clones con masa de la cadena pesada y ligera predicha de acuerdo con la masa del material derivado del hibridoma del mismo anticuerpo (como se determina por espectrometría de masas) se seleccionaron para estudio y expresión adicionales. Las secuencias resultantes se muestran en el Listado de Secuencias y la Figura 2 en el presente documento.

La Tabla 1 y la Tabla 2 (a continuación) dan una visión global de la información de secuencias de anticuerpos y la mayoría de secuencias de la línea germinal homóloga.

Tabla 1: Homologías de cadena pesada

Ac	GEN V y alelo	Identidad de REGIÓN V, % (nt)	GEN J y alelo	GEN D y alelo	CDR-IMGT longitudes
005	IGHV3-30-3*01	100,0 (288/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD3-10*01	8,8,17
006	IGHV3-30-3*01	98,6 (284/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD3-16*02	8,8,17
008	IGHV3-30-3*01	100,0 (288/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD3-16*02	8,8,17
011	IGHV3-33*01	99,7 (287/288 nt)	IGHJ6*02	IGHD3-10*01	8,8,16

Tabla 2: Homologías de cadena ligera

Ac	GEN V y alelo	Identidad de REGIÓN V, % (nt)	GEN J y alelo	CDR-IMGT longitudes
005	IGKV1D-16*01	99,6 (278/279 nt)	IGKJ4*01	6,3,9
006	IGKV1D-16*01	100,0 (279/279 nt)	IGKJ4*01	6,3,9
008	IGKV1D-16*01	100,0 (279/279 nt)	IGKJ4*01	6,3,9

011 IGKV1D-16*01 100,0 (279/279 nt) GEN J CDR-IMGT
IGKJ4*01 6,3,9

Tabla 3: Referencias al listado de secuencias:

Región VH	
SEQ ID No: 7	VH 005
SEQ ID No: 8	VH 005, CDR1
SEQ ID No: 9	VH 005, CDR2
SEQ ID No: 10	VH 005, CDR3
SEQ ID No: 11	VH 006
SEQ ID No: 12	VH 006, CDR1
SEQ ID No: 13	VH 006, CDR2
SEQ ID No: 14	VH 006, CDR3
SEQ ID No: 15	VH 008
SEQ ID No: 16	VH 008, CDR1
SEQ ID No: 17	VH 008, CDR2
SEQ ID No: 18	VH 008, CDR3
SEQ ID No: 19	VH 011
SEQ ID No: 20	VH 011, CDR1
SEQ ID No: 21	VH 011, CDR2
SEQ ID No: 22	VH 011, CDR3
Región VL	
SEQ ID No: 23	VL 005
SEQ ID No: 24	VL 005, CDR1 (=VL 011, VL 006 y VL 008 CDR1)
AAS	VL 005, CDR2 (=VL 011, VL 006 y VL 008 CDR2)
SEQ ID No: 25	VL 005, CDR3 (=VL 011, VL 006 y VL 008 CDR3)
SEQ ID No: 26	VL 006 = VL 008 = VL 011

Ejemplo 10

5

Purificación de anticuerpos

El sobrenadante del cultivo se filtró sobre filtros sin salida de 0,2 µm, se cargó en columnas de Proteína A de 5 ml (rProtein A FF, Amersham Bioscience) y se eluyó con ácido cítrico-NaOH 0,1 M, pH 3. El eluato se neutralizó inmediatamente con Tris-HCl 2 M, pH 9 y se dializó a NaH₂PO₄ 12,6 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4 (B. Braun), durante toda la noche. Después de la diálisis, las muestras se filtraron por esterilización sobre filtros sin salida de 0,2 µm. La pureza se determinó por SDS-PAGE y la concentración se midió por nefelometría y absorbancia a 280 nm. Los anticuerpos purificados se alicuotaron y almacenaron a -80 °C. Una vez descongeladas, las alícuotas de anticuerpo purificadas se mantuvieron a 4 °C. Se realizó espectrometría de masas para identificar la masa molecular de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo expresadas por los hibridomas como se describe en el Ejemplo 9.

15

Ejemplo 11

Unión de anticuerpos HuMab específicos de CD74 al dominio extracelular recombinante de dos isoformas de CD74, determinado por ELISA, y al CD74 celular en células Raji, determinado por FACS

20

La unión de anticuerpos HuMab anti-CD74 a dos isoformas de CD74 se midió por ELISA (dominio extracelular recombinante recubierto de CD74) y a CD74 celular en células Raji (ATCC, Manassas, VA) por análisis FACS.

25

Las placas de ELISA (Greiner BioOne) se recubrieron durante toda la noche a 4 °C con 2 µg/ml, 100 µl por pocillo de CD74v1 o CD74v2 recombinante en PBS (B. Braun Melsungen AG). Las secuencias y la producción de las

isoformas se describieron anteriormente. Los pocillos de ELISA se lavaron 3 veces con PBS que contenía 0,05 % de Tween 20 (PBST), se vaciaron y se bloquearon con fracción V de BSA al 1 % (p/v) (Roche) en PBS a TA durante 1 h mientras se agitaba (300 rpm) y se vació. Posteriormente, se añadieron anticuerpos 100 µl de HuMab anti-CD74 en diluciones en serie en fracción V de BSA al 0,2 % (p/v) en PBST (tampón de ensayo) y se incubaron en agitación a TA durante 90 min. Las placas de ELISA se lavaron tres veces con PBST, se vaciaron y se detectaron los anticuerpos HuMab unidos usando anti-IgG humana de cabra conjugada a HRP (100 µl; 1:5000; Peroxidase Affinipure Goat anti-human IgG, F(ab')₂ Fragment Specific [min X Bov,Hrs,Ms Sr Prot]; Jackson Immunoresearch) en tampón de ensayo y se incubó en agitación a TA durante 90 min. Las placas se lavaron tres veces con PBST, se vaciaron y se incubaron con 100 µl de solución ABTS (50 ml de tampón ABTS [Roche] y un comprimido de ABTS [50 mg; Roche]). Después de la incubación en oscuridad a TA durante 30 min, la reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl por pocillo de ácido oxálico (2 % [p/v]). Las placas se midieron a DO 405 nm en un lector ELISA (Biotek Instruments, EL808 Absorbance Microplate Reader).

Para el análisis FACS, se sembraron 10⁵ células en 100 µl de tampón FACS (PBS suplementado con 0,1 % BSA y 0,02 % azida sódica) por pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos. Las células se centrifugaron (1200 rpm, 4 °C, 5 min) y el sobrenadante se descartó. Se añadieron anticuerpos HuMab anti-CD74 diluidos en serie (100 µl) y se incubaron en hielo durante 1 h. Las células se lavaron con tampón FACS, los sobrenadantes se descartaron y se añadieron 100 µl de cabra anti-IgG humana marcada con R-Ficoeritrina (R-Phycoerythrin AffiniPure F(ab')₂ Frag Gt Anti-Human IgG, Fcy Frag Spec [min X Bov,Hrs,Ms Sr Prot]; Jackson Immunoresearch), diluido 1:100 en tampón FACS. Después de 1 h en hielo (en oscuridad), las células se lavaron una vez en tampón FACS, el sobrenadante se descartó y se detectó la unión específica de los anticuerpos HuMab por Citometría de flujo en un FACS Canto II (BD Biosciences).

Se usó el Ac de isotipo control IgG1-b12 como un control negativo. Las curvas de unión se analizaron usando regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) usando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

La Figura 3 muestra que el HuMab-CD74-006 y -011 se unieron con alta afinidad (valores CE₅₀ entre 210 y 344 ng/ml) a ambas isoformas del dominio extracelular de CD74. HuMab-CD74-008 se unió con afinidad intermedia (CE₅₀ entre 759 y 1391 ng/ml) a ambas isoformas.

La Figura 4 muestra que los HuMab-CD74-006 y -011 también se unieron con alta afinidad (CE₅₀ entre 150 y 200 ng/ml) a CD74 celular expresado por las células Raji. HuMab-CD74-008 y -005 se unieron a CD74 celular con afinidad intermedia (los valores CE₅₀ no pudieron determinarse porque no se alcanzó la unión máxima).

La Tabla 4 muestra valores CE₅₀ de anticuerpos HuMab específicos de CD74 para la unión al dominio extracelular de CD74v1 y CD74v2 por ELISA y a CD74 celular por FACS en células Raji.

Tabla 4: Vista global de valores CE₅₀ para la unión de anticuerpos HuMab específicos de CD74 al dominio extracelular de CD74v1 y CD74v2, determinados por ELISA, y a CD74 celular en células Raji, determinados por FACS. Todos los anticuerpos HuMab se produjeron co-transfectando transitoriamente células HEK293F con vectores de expresión relevantes de cadenas pesadas y ligeras (como se describe anteriormente)

HuMab-CD74-	CE ₅₀ (ELISA)		CE ₅₀ (FACS)
	CD74v1	CD74v2	
005	nt	nt	nd
006	321	210	196
008	1391	759	nd
011	344	245	151

Los valores CE₅₀ están en ng/ml.

nd - no pudo calcularse.

Nt - no testado.

Ejemplo 12

Reactividad cruzada de anticuerpos HuMab anti-CD74 a tejidos de macaco

La capacidad de los anticuerpos HuMab específicos de CD74 de unirse al CD74 de macaco se ensayó por inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica con anticuerpos HuMab anti-CD74 se realizó en amígdala de humano y tejido de nodo linfático de macaco congelados, con expresión de CD74 anticipada en linfocitos B (foliculares) y macrófagos. Se cortaron secciones de tejido congelado (espesor de 4-6 µm) y se fijaron en acetona. Los anticuerpos HuMab se complejaron con fluoresceína-isotiocianato (FITC) por incubación con anti-IgG (Fc)-FITC (Fab) humana de cabra (Protos) (relación 1:1 con Humab). Antes de la tinción de HuMab (1 µg/ml), los tejidos se bloquearon para la biotina, la peroxidasa (PO) y las inmunoglobulinas endógenas. Se detectó el complejo HuMab-Fab-FITC por

posteriores incubaciones con anti-FITC de conejo (Invitrogen) (diluido 1:1000) y anti-IgG de conejo de cabra conjugado a PO (Powervision, [rb IgG]-PO; sin diluir). La actividad de PO se visualizó con amino-etil-carbazol (AEC) como sustrato, dando como resultado un color rojo y los núcleos se visualizaron con hematoxilina (azul). Las tinciones de tejidos se examinaron al microscopio óptico (Axioskop-2 plus), se convirtieron en imágenes digitales mediante una cámara AxioCam y se almacenaron como imágenes digitales.

La Figura 5 muestra que HuMab-CD74-006 y -011 mostraron reactividad cruzada con CD74 de macaco, como se muestra por la tinción de macrófagos y células B foliculares (la tinción para el control de isotipo es negativa). El grado de reactividad cruzada con CD47 de macaco fue menos para HuMab-CD74-006 que para -011, como se muestra por una tinción menos intensa del tejido de macaco en comparación con el tejido humano.

Ejemplo 13

Inducción de ADCC y CDC

La inducción de ADCC por anticuerpos HuMab específicos de CD74 se ensayó en un ensayo de liberación de ^{51}Cr . Brevemente, las células Raji se marcaron con 100 μCi de ^{51}Cr y se usaron como células diana. Se usaron células mononucleares de sangre periférica, asiladas de capas leucocitarias, como células efectoras. Las células diana se pre-incubaron con anticuerpos HuMab anti-CD74 (TA, 30 min) y se añadieron células efectoras, dando como resultado una relación de efector a diana de 100:1, y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO_2 , durante toda la noche. Se midió la liberación de ^{51}Cr en el sobrenadante en un contador gamma. No se detectó inducción significativa de ADCC por anticuerpos HuMab anti-CD74.

La inducción de CDC por anticuerpos HuMab anti-CD74 se ensayó usando el método de yoduro de propidio. Brevemente, las células Raji se pre-incubaron con anticuerpos HuMab anti-CD74 (TA, 15 min) y se añadió suero humano normal a una concentración final del 20 % y se incubó a 37 °C, 5 % de CO_2 durante 45 min. Las placas se pusieron en hielo para detener la reacción. Se añadió yoduro de propidio y las células se analizaron por análisis FACS. No se detectó inducción significativa de CDC por anticuerpos HuMab anti-CD74.

Ejemplo 14

Internalización y muerte celular mediadas por anticuerpo por anticuerpos HuMab anti-CD74 en un ensayo anti-kappa-ETA'

Para evaluar la adecuabilidad de los anticuerpos HuMab anti-CD74 para un enfoque de conjugado anticuerpo-fármaco, se desarrolló un ensayo genérico *in vitro* basado en muerte celular usando la exotoxina A de *Pseudomonas* dirigida a kappa (anti-kappa-ETA'). En este ensayo, se usó una construcción que consistía en un anticuerpo anti-dominio de cadena ligera kappa humana y una forma truncada de la exotoxina A de *Pseudomonas* más un motivo de retención KDEL. Tras la internalización, la construcción anti-kappa-dominio-anticuerpo-ETA' se somete a proteólisis y reducción del enlace disulfuro, separando el dominio catalítico y el de unión. Se cree que el dominio catalítico se transporta desde el sistema de Golgi hasta el retículo endoplasmático a través del 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).

La internalización mediada por anticuerpo y la muerte celular por la toxina se ensayaron para diferentes anticuerpos HuMab anti-CD74 con células Raji. El número de moléculas CD74 expresadas en la superficie de la célula Raji se estimó ser 10^4 moléculas por célula, usando el método QFIKIT® (Dako, Glostrup, Dinamarca). Se sembraron 10^4 células por pocillo en un medio de cultivo en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos (Greiner Bio-One). Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 h, para dejar las células asentar. Para identificar anticuerpos HuMab anti-CD74 que permitan la internalización de y la muerte por la toxina, se pre-incubó una concentración fija (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de concentración final en los pocillos) de anti-kappa-ETA', que no indujo muerte celular no específica en ausencia de anticuerpo, durante 30 min con una cantidad titulada de anticuerpos HuMab anti-CD74 antes de la adición a las células. Después de tres días, la cantidad de células viables se cuantificó con AlamarBlue (BioSource International, San Francisco, EE.UU.), añadiendo en 10 μl por pocillo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la incubación a 37 °C durante 4 h, la fluorescencia se monitorizó usando el lector EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Finlandia) con ajustes AlamarBlue convencionales. Se usó como un control negativo un anticuerpo control de isotipo (IgG1-b12), pre-incubado con anti-kappa-ETA'. Se usó estaurosporina (Sigma-Aldrich) como un control para determinar la señal de fondo y se añadió a las células a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

La viabilidad en porcentaje se calculó como sigue:

$$(\text{FL}_{\text{tratado}} - \text{FL}_{\text{fondo}}) / (\text{FL}_{\text{control}} - \text{FL}_{\text{fondo}}) \times 100 \%$$

$\text{FL}_{\text{control}}$ = fluorescencia de los pocillos sin tratar

FL_{fondo} = fluorescencia de pocillos tratados con estaurosporina.

La Figura 6 y la Tabla 5 muestran que los anticuerpos HuMab anti-CD74 pre-incubados anti-kappa-ETA' fueron capaces de matar células Raji de manera dependiente de dosis. HuMab-CD74-006, -011, -005 y -008 pre-incubados anti-kappa-ETA' indujeron muerte eficaz (CE_{50} entre 25 y 250 $\mu\text{g/ml}$ y una viabilidad en porcentaje mínima que quedó entre 0 y 15). El mAc IgG1-b12 control pre-incubado anti-kappa-ETA' no indujo muerte celular.

5 **Tabla 5** - Vista global de valores CE_{50} y porcentajes de viabilidad celular que quedan después del tratamiento de células Raji con anticuerpos HuMab anti-CD74 pre-incubados anti-kappa-ETA'. Los datos mostrados son valores CE_{50} (en $\mu\text{g/ml}$) y porcentajes mínimos de viabilidad de células Raji tratadas con anticuerpos HuMab anti-CD74 pre-incubados anti-kappa-ETA', medidos en un experimento representativo.

Anticuerpo (HuMab-CD74-)	% de viabilidad	CE_{50}
005	3,24	120
006	1,50	57
008	14,65	247
011	0,47	25
IgG 1-b12	85,89	n.d. ^{a)}

a) No pudo calcularse.

10 Ejemplo 15

Preparación de ADC específicos de CD74

15 Se produjeron HuMab-CD74-005, HuMab-CD74-006, HuMab-CD74-011 y el control negativo IgG 1-b12 en células HEK-293F. Los anticuerpos se purificaron por cromatografía de Proteína A de acuerdo con procedimientos convencionales, finalmente produciendo aproximadamente 263 mg de HuMab-CD74-005, 165 mg de HuMab-CD74-006 y 720 mg de HuMab-CD74-011 purificados. La cantidad de anticuerpo conjugado obtenida se muestra en la Tabla 6. El fármaco-conector vcMMAE o mcMMAF se alquiló a las cisteínas de los anticuerpos reducidos de acuerdo con los 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 inactivó por la adición de un exceso de N-acetilcisteína. Cualquier fármaco residual sin conjugar se retiró por diafiltración y los conjugados de fármaco anticuerpo específicos de CD74 finales se formularon en PBS.

25 Los conjugados de fármaco anticuerpo específicos de CD74 se analizaron posteriormente para la concentración (por absorbancia a 280 nm), la relación de fármaco a anticuerpo ("DAR") por cromatografía de fase inversa (RP-HPLC) y cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), la cantidad de fármaco sin conjugar (por cromatografía de exclusión por tamaño, SEC-HPLC) y los niveles de endotoxina (por ensayo de endotoxinas de Lisado de Amebocito Limulus (LAL)). Los resultados se muestran en la Tabla 7.

30

Tabla 6 - Cantidad de ADC obtenida

HuMab-CD74-	Conector-fármaco	Cantidad de ADC (mg)
005	vcMMAE	94
005	mcMMAF	91
006	vcMMAE	63
006	mcMMAF	60
011	vcMMAE	276
011	mcMMAF	293
b12	vcMMAE	174
b12	mcMMAF	245

Tabla 7 - Análisis de Conjugados Fármaco-Anticuerpo

Ensayo	HuMab-CD74-005		HuMab-CD74-006		HuMab-CD74-011		IgG1-b12	
	vcMMAE	mcMMAF	vcMMAE	mcMMAF	vcMMAE	mcMMAF	vcMMAE	mcMMAF
Concentración (mg/ml)	7,2	6,4	6,4	6,2	8,2	8,1	6,6	9,1
DAR por RP-HPLC	3,9	3,9	4,0	3,7	3,8	*	3,2	3,9
DAR por HIC	4,0	4,0	4,0	4,1	3,9	3,9	3,3	4,0
% de fármaco sin conjugar	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
% de agregados por SEC-HPLC	1,3	1,2	0,7	0,3	0,7	0,3	0,8	1,0
Endotoxina (EU/mg)	0,199	0,152	0,101	0,085	0,200	0,083	0,078	0,104

* No pudo asignarse DAR debido a co-elución de picos

Ejemplo 16**Unión de ADC anti-CD74 al dominio extracelular recombinante de CD74v1, determinado por ELISA**

- 5 La unión de ADC específicos de CD74 a CD74 se midió por ELISA (dominio extracelular recombinante recubierto de CD74v1) y se comparó con la unión de anticuerpos HuMab específicos de CD74 sin conjugar.

10 Las placas de ELISA (Greiner BioOne) se recubrieron con 2 µg/ml, 100 µl por pocillo, de CD74ECDHis recombinante en PBS (B. Braun Melsungen AG) a 4 °C, durante toda la noche. Las placas de ELISA se vaciaron y se bloquearon con 200 µl/pocillo de PBS que contiene un 0,05 % de Tween-20 (PBST) en agitación (300 rpm) a TA durante 1 h, se lavó tres veces con 300 µl de PBST y se vació. Posteriormente, se añadieron 100 µl de ADC anti-CD74 o anticuerpos HuMab específicos de CD74 en diluciones en serie en PBST y se incubaron en agitación a TA durante 2 h. Las placas de ELISA se lavaron veces con PBST y se vaciaron. Se detectaron los anticuerpos HuMab sin conjugar y los ADC anti-CD74 por adición de anti-IgG humana de ratón conjugada a HRP (100 µl; 0,015 µg/ml; Sanquin; n.º M1328) en PBST y se incubó mientras se agitaba, a TA durante 2 horas. Las placas se lavaron con PBST, se vaciaron y se incubaron con 100 µl de solución ABTS (50 ml de tampón ABTS [Roche] y un comprimido de ABTS [50 mg; Roche]). Después de la incubación en oscuridad en agitación, a TA durante 30 min, la reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl por pocillo de ácido oxálico (2 % [p/v]; Riedel de Haen) en oscuridad en agitación, durante 10 min. Las placas se midieron a DO 405 nm en un lector ELISA (Biotek Instruments, EL808 Absorbance Microplate Reader).

25 IgG1-b12, un anticuerpo que se une a un antígeno no relacionado, se usó como un control negativo (tanto sin conjugar como en formato ADC). Las curvas de unión se analizaron por regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) usando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

30 Todos los anticuerpos HuMab anti-CD74 y ADC se unieron dentro de un intervalo similar al dominio extracelular CD74v1 en un ELISA (calores CE₅₀ entre 0,02 y 0,04 µg/ml), como se demostró por las curvas de unión en la Figura 7. La Tabla 8 muestra valores CE₅₀ de anticuerpos HuMab específicos de CD74 y ADC para la unión al dominio extracelular de CD74.

Tabla 8 - Vista global de valores CE₅₀ para la unión de anticuerpos y ADC HuMab específicos de CD74 al dominio extracelular de CD74v1, determinado por ELISA. Los valores CE₅₀ están en µg/ml. Los datos mostrados son valores CE₅₀ medios calculados a partir de cuatro experimentos independientes.

HuMab-CD74-	CE ₅₀ (ELISA)		
	Sin conjugar	vcMMAE	mcMMAF
005	0,03	0,04	0,04
006	0,02	0,03	0,02
011	0,02	0,03	0,02

35

Ejemplo 17**Unión de ADC específicos de CD74 a CD74 expresado en superficie, determinado por análisis FACS en células Daudi**

40 La unión de ADC anti-CD74 a CD74 expresado en superficie se midió por análisis FACS en células Daudi y se comparó con la unión de anticuerpos HuMab anti-CD74.

45 Se sembraron 1 x 10⁵ células Daudi en 100 µl PBS que contiene 0,1 % de seroalbúmina bovina (BSA) (Roche, cat. n.º 10735086001) y 0,02 % azida sódica (Sigma-Aldrich, (Sigma-Aldrich, cat. n.º 13412) (tampón FACS) por pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Greiner bio-one, cat. n.º 650101). Las células se centrifugaron (1200 rpm, 4 °C, 3 min) y el sobrenadante se descartó. Se añadieron anticuerpos o ADC HuMab anti-CD74 diluidos en serie (100 µl) y se incubaron en hielo durante 30 min. Las células se lavaron dos veces con 150 µl de tampón FACS y se añadieron 100 µl de anti-IgG-FITC humana de conejo (cat. n.º F0185, Dako), diluido 1:100 en tampón FACS.

50 Después de 30 min en hielo (en oscuridad), las células se lavaron dos veces en 150 µl de tampón FACS y se detectó la unión específica de los anticuerpos y ADC HuMab por Citometría de flujo en un FACS Canto II (BD Biosciences).

55 El anticuerpo de control de isotipo IgG1-b12, un anticuerpo que se une a un antígeno no relacionado, se usó como un control negativo (tanto sin conjugar como en formato ADC). Las curvas de unión se analizaron por regresión no lineal (respuesta a dosis sigmoidea con pendiente variable) usando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

La Figura 8 muestra curvas de unión y las Tablas 9 y 10 muestran valores CE₅₀ e intensidades de fluorescencia medias máximas para la unión a CD74 expresado en superficie de anticuerpos HuMab anti-CD74 y ADC. Todos

menos un anticuerpo HuMab anti-CD74 conjugados se unieron a CD74 expresado en superficie de células Daudi con una afinidad similar a los anticuerpos HuMab sin conjugar correspondientes. El conjugado vcMMAE de HuMab-CD74-005 se unió con mayor afinidad (valor CE₅₀ más bajo) que el HuMab sin conjugar. HuMab-CD74-005 y su conjugado mcMMAF se unieron con menor afinidad que HuMab-CD74-006 y -011 y sus conjugados. La unión máxima fue menor para HuMab-CD74-006 y -011 conjugados a vcMMAE que para los anticuerpos HuMab sin conjugar correspondientes.

Tabla 9 - Visión global de valores CE₅₀ para la unión de anticuerpos y ADC HuMab específicos de CD74 a CD74 expresado en superficie, determinado por análisis FACS en células Daudi. Los valores CE₅₀ están en µg/ml. Los datos mostrados son valores CE₅₀ medios calculados a partir de tres experimentos independientes

HuMab-CD74-	CE ₅₀ (FACS)		
	Sin conjugar	vcMMAE	mcMMAF
005	1,27	0,26	1,05
006	0,04	0,03	0,03
011	0,05	0,05	0,05

Tabla 10 - Visión global de intensidades de fluorescencia media a 10 µg/ml de anticuerpos y ADC HuMab específicos de CD74, determinado por análisis FACS en células Daudi. Los datos mostrados son valores MFI máximos medios como se mide a 10 µg/ml de mAc y ADC HuMab-CD74. Los valores MFI máximos medios se calcularon a partir de tres experimentos independientes.

HuMab-CD74-	Unión máxima (FACS)		
	Sin conjugar	vcMMAE	mcMMAF
005	2784	2863	2526
006	4599	3277	4050
011	5782	3791	5330

Ejemplo 18

Internalización y muerte celular mediadas por anticuerpo por ADC anti-CD74 en un ensayo de muerte *in vitro*

Para determinar la capacidad de ADC anti-CD74 para inducir la citotoxicidad, se realizó un ensayo de muerte celular *in vitro*.

La muerte celular de cuatro líneas celulares se ensayó para los diferentes ADC anti-CD74. Todas las líneas celulares se obtuvieron de la American Tissue Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.): Raji (cat. n.º CCL-86), Daudi (cat. n.º CCL-213), M4A4 (cat. n.º CRL-2914; derivada de la línea celular humana MDA MB 435) y células NCI-H747 (cat. n.º CCL-252, derivadas de metástasis de adenocarcinoma colorrectal). Las células se sembraron en concentración óptima (Raji: 1 x 10⁴ células/pocillo; Daudi: 1 x 10³ células/pocillo, M4A4: 2 x 10³ células/pocillo, NCI-H747 3 x 10³ células/pocillo) en 100 µl de medio de cultivo celular (para Daudi y Raji; RPMI 1640 [Lonza, cat. n.º BE12-115F] suplementado con Suero de Ternera Cósmica 10 % [Perbio Science Países Bajos B.V., cat. n.º SH30087.04], L-glutamina 2 mM [Lonza, cat. n.º BE17-605F] y Piruvato sódico 1 mM [Lonza, cat. n.º BE13-115E]; para NCI-H747: RPMI 1640 suplementado con Suero de Ternera Cósmica 10 %, Piruvato sódico 1 mM, Bicarbonato sódico al 0,15 % [Lonza, cat. n.º BE17-613E] y 0,5 % Glucosa [Sigma, cat. n.º G8769]; y para M4A4: DMEM [Lonza, cat. n.º BE12-709F] suplementado con Suero de Ternera Cósmica 10 %) en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos (Greiner Bio-one) y se dejaron adherir. Se añadieron diluciones en serie de ADC anti-CD74 y se incubaron a 37 °C durante tres (Raji, Daudi) o cinco (M4A4, NCI-H747) días. La cantidad de células viables se cuantificó con AlamarBlue (cat. n.º DAL1100, BioSource International, San Francisco, US) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se monitorizó usando el lector EnVision 2101 Multilabel (PerkinElmer, Turku, Finlandia) con ajustes AlamarBlue convencionales. Se usaron ADC IgG1-b12 (un anticuerpo que se une a un antígeno no relacionado) como control negativo. Se usó estaurosporina (Sigma n.º S6942) para inducir la muerte celular máxima. La cantidad de moléculas CD74 en las líneas celulares se determinó por QIFIKIT® (Dako, Glostrup, Dinamarca), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando anti-CD74 IgG de ratón (clon By2; Santa Cruz, cat. n.º SC-20062) y anticuerpo de control de isotipo (CBL, n.º cat M1415). Ambos anticuerpos se usaron a una concentración de 10 µg/ml. Se determinó que las células Raji y Daudi expresan ~ 20 000; y las células M4A4 ~ 11 000 moléculas CD74 en la superficie celular.

La Figura 9 y la Tabla 11 muestran que todos los ADC anti-CD74 fueron capaces de matar células Raji, Daudi y M4A4 en una manera dependiente de dosis. Los valores CI₅₀ para todos los conjugados fueron aproximadamente 5-12 veces más altos en células M4A4 (Es decir, eficacia menor) expresando aproximadamente niveles seis veces menores de CD47. Las células NCI-H747 solamente murieron a la dosis más alta de ADC ensayada (10 µg/ml). Para HuMab-CD74-006 y -011 mcMMAF los conjugados fueron ligeramente más eficientes induciendo la muerte de células Daudi y Raji que los conjugados vcMMAE (CI₅₀-006: en las células Daudi tres veces menor y en las células

Raji cinco veces menor; CI₅₀ -011: en las células Daudi dos veces menor y en las células Raji cuatro veces menor).

Tabla 11 - vista general de valores CI₅₀ y porcentajes de muerte celular inducida por ADC anti CD74. Los datos mostrados son valores CI₅₀ medios (en µg/ml) y la muerte en porcentaje máximo medio (a una concentración de 10 µg/ml) de las líneas celulares indicadas tratadas con ADC anti-CD74. Los datos se calcularon a partir de tres experimentos independientes. Los porcentajes de muerte celular (% muerte) se calcularon como sigue:

$$(MFI_{\text{sin tratar}} - MFI_{\text{tratado con ADC anti-CD74}}) / (MFI_{\text{sin tratar}} - MFI_{\text{tratado con estauroporina}}) \times 100 \%$$

ADC	Raji		Daudi		M4A4		NCI-H747	
	% de muerte	CI ₅₀						
005-vcMMAE	88	0,11	85	0,08	100	0,56	41	7,48
005-mcMMAF	92	0,05	90	0,03	97	0,38	5	N.A. ^{a)}
006-vcMMAE	90	0,05	85	0,03	100	0,28	49	6,12
006-mcMMAF	93	0,01	93	0,01	97	0,12	21	N.A. ^{a)}
011-vcMMAE	89	0,04	86	0,02	100	0,32	40	7,91
011-mcMMAF	92	0,01	92	0,01	96	0,10	17	N.A. ^{a)}

a) No pudo calcularse ya que el nivel de plató de la curva no se alcanzó

Ejemplo 19

Tratamiento terapéutico de xenoinjertos de tumor Daudi en ratones SCID con ADC específicos de CD74

La efectividad *in vivo* de los ADC HuMab-CD74-011 se determinó en tumores de xenoinjerto (linfoma de Burkitt) Daudi establecidos intravenosos (i.v.) en ratones SCID.

Las células Daudi se transfectaron por electroporación con el gen gWIZ de la luciferasa (Aldevron, Fargo, ND, USA) y el vector pPur (BD Biosciences, Alphen a/d Rijn, The Netherlands) en una relación 4:1. Después de 48 h, se añadió puromicina para la selección de un clon transfectado establemente (Daudi-luc). Las células Daudi-luc #1E3 se cultivaron en RPMI suplementado con suero de ternera cósmica 10 % (cat. n.º SH30087.04, Hyclone), 1 % de penicilina/estreptomicina (cat. n.º DE17-603, Cambrex, Alemania), 1 % de piruvato sódico y 1 µg/ml de puromicina (cat. n.º P-8833, Sigma, Zwijndrecht, Países Bajos). Se inyectaron 2,5 x 10⁶ células de tumor luc Daudi seguido de una formación de imágenes a intervalos semanales empezando el día 14. Para las imágenes, los ratones se anestesiaron usando isoflurano, seguido de administración intraperitoneal de 2,5 mg de D-luciferina (forma ácida, cat.no. BT11-1000; Biothema, Haninge, Suiza) en 200 µl 10 mg/ml TRIS (cat.no. T60666-1kg, Sigma). La formación de imagen de bioluminiscencia (BLI) desde el lado de la espalda (vista dorsal) empezó 10 min después de la administración de D-luciferina, 5 min de tiempo de exposición, en un Biospace Imager. Se hicieron las imágenes en blanco y negro para la referencia anatómica. Los ratones se trataron dos veces a la semana con 60 µg (~3 mg/kg) HuMab-CD74-011 y anticuerpo control (IgG1-b12), tanto como ADC como con IgG1 sin conjugar, en 100 µl PBS desde el día 21 después de la inoculación del tumor, cuatro veces en total. Antes del tratamiento, los ratones se dividieron en grupos de siete ratones cada uno, teniendo cada grupo señales BLI promedio iguales y varianzas iguales.

La Figura 10 muestra que tanto HuMab-CD74-011-vcMMAE como -mcMMAF fueron eficaces reduciendo el tamaño de los tumores Daudi-luc i.v. Como se muestra en la Figura 10, hubo una tendencia evidente de una inhibición más alta del crecimiento del tumor en el caso de HuMab-CD74-011 conjugado en comparación con el grupo anticuerpo control, aunque las diferencias no fueron significativas.

Ejemplo 20

Tratamiento terapéutico de xenoinjertos de tumor Raji en ratones SCID con ADC anti-CD74

La efectividad *in vivo* de los ADC anti-CD74 se determinó también en el modelo de tumores de xenoinjerto Raji i.v. en ratones SCID.

Las células Raji se transfectaron por electroporación con el gen gWIZ de la luciferasa (Aldevron, Fargo, ND, USA) y el vector pPur (BD Biosciences, Alphen a/d Rijn, The Netherlands) en una relación 4:1. Después de 48 h, se añadió puromicina para la selección de un clon transfectado establemente (Raji-luc). Las células Raji-luc #2D1 se cultivaron en RPMI suplementado con suero de ternera cósmica 10 % (cat. n.º SH30087.04, Hyclone), 1 % de penicilina/estreptomicina (cat. n.º DE17-603, Cambrex, Alemania), 1 % de piruvato sódico y 1 µg/ml de puromicina (cat. n.º P-8833, Sigma, Zwijndrecht, Países Bajos). Se inyectaron 2,5 x 10⁶ células de tumor Raji-luc en 100 µl de PBS i.v. en la vena de la cola de ratones SCID hembra. Los ratones se formaron imágenes directamente después de

la inoculación del tumor, seguido de una formación de imágenes a intervalos semanales empezando el día 7 hacia atrás. Para las imágenes, los ratones se anestesiaron usando isoflurano, seguido de administración intraperitoneal de 2,5 mg de D-luciferina (forma ácida, cat.no. BT11-1000; Biothema, Haninge, Suiza) en 200 μ l 10 mg/ml TRIS (cat.no. T60666-1kg, Sigma). La formación de imagen de bioluminiscencia (BLI) desde el lado de la espalda (vista dorsal) empezó 10 min después de la administración de D-luciferina, 5 min de tiempo de exposición, en un Biospace Imager. Se hicieron las imágenes en blanco y negro para la referencia anatómica. Los ratones se trataron dos veces a la semana con 60 μ g (~3 mg/kg) HuMab-CD74-011 o anticuerpo control (IgG1-b12), tanto como ADC como con IgG1 sin conjugar, en 100 μ l PBS desde el día 11 después de la inoculación del tumor, cuatro veces en total. Antes del tratamiento, los ratones se dividieron en grupos de siete ratones cada uno, teniendo cada grupo señales BLI promedio iguales y varianzas iguales.

La Figura 11 muestra que tanto HuMab-CD74-011-vcMMAE como -mcMMAF eliminaron prácticamente cualquier tumor Raji-luc. Como se muestra en la Figura 11, hubo una tendencia evidente de una inhibición más alta del crecimiento del tumor en el caso de HuMab-CD74-011 conjugado en comparación con el grupo anticuerpo control, aunque las diferencias no fueron significativas.

Ejemplo 21

Tratamiento terapéutico de xenoinjertos de tumor Raji en ratones SCID con ADC anti-CD74

La efectividad *in vivo* de los ADC anti-CD74 se determinó también tumores de xenoinjerto establecidos subcutáneos (s.c.) Raji (linfoma de Burkitt) en ratones SCID.

Se inyectaron $2,5 \times 10^6$ células de tumor Raji-luc#2D1 (obtenidas como se describe en el Ejemplo 20) en 200 μ l de PBS s.c. en el flanco derecho de ratones SCID hembra, seguido de dos inyecciones con ADC anti-CD74 o controles (IgG1-b12; tanto como ADC como con IgG1 sin conjugar), uno cuando los tamaños de tumores alcanzaron un promedio de 400 mm^3 , el día 17 y el otro cuatro días más tarde, el día 21 (por inyección 60 μ g/ratón, ~3 mg/kg, en 100 μ l, intraperitonealmente. Antes del primer tratamiento, los ratones con crecimiento tumoral se dividieron en grupos con igual distribución de volumen tumoral. El volumen tumoral se determinó al menos dos veces a la semana. Los volúmenes tumorales (mm^3) se calcularon a partir de mediciones con calibre (PLEXX) como: $0,52 \times (\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2$.

La Figura 12 muestra que todos los ADC anti-CD74 redujeron eficazmente el tamaño de los tumores Raji-luc establecidos s.c. Los tumores en ratones tratados IgG1-b12 tanto como ADC como sin conjugar, continuaron creciendo.

Ejemplo 22

Tratamiento terapéutico de xenoinjertos de tumor M4A4 en ratones SCID con ADC anti-CD74

La eficacia *in vivo* de ADC anti-CD74 se determinó también en tumores de xenoinjerto M4A4 establecidos subcutáneos (s.c.) en ratones SCID. Las células de melanoma M4A4 (cat. no. CRL-2914; American Tissue Culture Collection, ATCC; derivado de la línea celular humana MDA-MB-435) se cultivaron en DMEM (cat. no. BE12-709F, Cambrex, Alemania) que contiene suero de ternera cósmica 10 % (cat. no. SH30087.04, Hyclone, Países bajos) and 1 % de penicilina/estreptomina (cat. no. DE17-603, Cambrex, Alemania). Se inyectaron 10^7 células de tumor M4A4 en 200 μ l de PBS s.c. en el flanco derecho de ratones SCID hembra, seguido de dos inyecciones con ADC anti-CD74 o controles (IgG1-b12; tanto como ADC como con IgG1 sin conjugar), uno cuando los tamaños de tumores alcanzaron un promedio de ~200 mm^3 , el día 11, el día 14, el día 18 y el día 21 (por inyección 60 μ g/ratón, ~3 mg/kg, en 100 μ l, intraperitonealmente). Antes del primer tratamiento, los ratones con crecimiento tumoral se dividieron en grupos con igual distribución de volumen tumoral. El volumen tumoral se determinó al menos dos veces a la semana. Los volúmenes tumorales (mm^3) se calcularon a partir de mediciones con calibre (PLEXX) como: $0,52 \times (\text{longitud}) \times (\text{anchura})^2$.

La Figura 13 muestra que, aunque todos los ADC anti-CD74 redujeron eficazmente el crecimiento tumoral de tumores M4A4 establecidos s.c., los conjugados vcMMAE redujeron fuertemente el tamaño del tumor. En comparación con IgG1-b12 sin conjugar, los ADC de IgG1-b12 redujeron ligeramente el crecimiento del tumor.

Ejemplo 23

Determinación de la tasa de desacoplamiento de anticuerpos HuMab anti-CD74 en células Daudi

Este ejemplo describe la determinación de la tasa de desacoplamiento de anticuerpos HuMab anti-CD74 en la unión a células Daudi.

Los anticuerpos se marcaron con el Tinte Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes), en lo sucesivo "Alexa-488", usando el siguiente procedimiento:

Se preparó una solución de anticuerpo de IgG 1 mg/ml en tampón carbonato sódico 0,1 M pH 9,0 (NaHCO₃, Riedel de Haen, n.º cat. 31437;). Alexa-488 se preparó recientemente, añadiendo 100 µl de DMSO (Sigma, n.º cat. D2438) a un vial (Alexa Fluor® 488 ácido carboxílico, éster de succinimidilo (1 mg/vial), Molecular Probes, Leiden, Países Bajos, cat. n.º A-20000). Se añadió un exceso molar de 25 veces de Alexa-488, calculado como se indica a continuación, a la solución de IgG y se incubó, mientras se giraba, en oscuridad a TA durante 1 hora. Después de marcar, se retiró Alexa-488 sin unir, usando una columna PD-10 (Amersham Biosciences, cat. n.º 17-0851-01), con tampón Tris pH 8,0 (50 mM Tris [Trizma base, Sigma, cat. n.º T-6066]; NaCl 100 mM [Riedel de Haen, cat. n.º 31437]; azida sódica al 0,01 % [NaN₃, Riedel de Haen, cat. n.º 13412]). La cantidad de Alexa-488 a añadirse a la solución de IgG se calculó usando la fórmula:

$$\text{Volumen de Alexa-488 a añadirse (en } \mu\text{l)} = (\text{conc IgG (mg/ml)}/\text{MW IgG (Da)} * \text{relación} * \text{volumen} * \text{MW Alexa-488} * 1000.$$

MW IgG = 150 000 Da; la relación es el exceso molar de Alexa-488 a usarse; el volumen es el volumen de la muestra a marcarse (en ml); MW Alexa-488 = 634 Da.

La concentración de proteína (IgG) y el grado de marcaje (D.O.L.) se determinaron midiendo DO a 280 nm y 650 nm en un Ultrospec 2100 Pro (Amersham Biosciences). La concentración de IgG (mg/ml) se calculó usando la fórmula:

$$\text{Concentración de IgG} = [A_{280} - (0,03 * A_{495})]/\text{coeficiente de extinción de IgG}.$$

D.O.L. se calculó usando la fórmula:

$$\text{D.O.L.} = A_{495}/71\ 000/[A_{280} - (0,11 * A_{495})]/(\text{coeficiente de extinción de IgG} * \text{MW IgG}).$$

71 000 es el coeficiente de extinción de Alexa-488 a λ_{max} en $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$; 0,11 es el factor de corrección (A_{280} tinte libre/ A_{max} tinte libre) (cambios proporcionados por el fabricante).

La seroalbúmina bovina (BSA; Sigma, cat. n.º A 2934) se añadió a partir de una solución al 10 % (p/v) a una concentración final de 0,1 % (p/v) y los anticuerpos marcados se almacenaron a 5 °C.

Las células Daudi se incubaron con anticuerpos HuMab anti-CD74 marcados con Alexa-488. Las células Daudi se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo. Se sembraron 10⁵ células por pocillo en tampón FACS enfriado en hielo en placas de fondo redondo de 96 pocillos de cultivo de tejidos (Greiner Bio-One). Se añadieron 0,5 µg/ml (HuMab-CD74-006 y -011; concentración final) o 1 µg/ml (HuMab-CD74-008; concentración final) anti-CD74 HuMab marcados Alexa-488 se añadieron en tampón FACS enfriado en hielo. Después de la incubación en hielo durante 30 min, se añadieron 50 µg/ml (HuMab-CD74-006 y -011; concentración final) o 100 µg/ml (HuMab-CD74-008; concentración final) de HuMab anti-CD74 sin marcar y se incubaron en hielo durante diferentes intervalos de tiempo variando de 15 a 180 min. El tiempo de incubación total con el anticuerpo sin marcar se indica a continuación de los gráficos. Para determinar la unión máxima, las células Daudi se incubaron con anticuerpos HuMab marcados con Alexa-488 en hielo durante 30 min. Como control negativo, las células se incubaron con el anticuerpo control de isotipo IgG1-b12 (0,5 µg/ml concentración final), seguido de IgG1-b12 sin marcar (50 µg/ml concentración final). Después de la incubación de anticuerpos, las células se lavaron una vez en tampón FACS y se detectaron los anticuerpos HuMab anti-CD74 marcados con Alexa por Citometría de flujo en un FACS Canto II (BD Biosciences).

La Figura 14 muestra que las tasas de desacoplamiento de HuMab-CD74-006 y -008 medidas a 0 °C fueron bastante rápidas (la mitad de los anticuerpos unidos marcados con Alexa-488 se reemplazaron por anticuerpos sin marcar entre ~3 y ~4 min a 0 °C, los valores K fueron 0,24 y 0,20 min⁻¹; [K = k_{off}]), mientras que la tasa de desacoplamiento de -011 medida a 0 °C fue un poquito más lenta (la mitad de los anticuerpos unidos marcados con Alexa-488 se reemplazaron por anticuerpos sin marcar entre ~10 min a 0 °C, el valor K fue 0,07 min⁻¹).

Ejemplo 24

Internalización y acumulación de anticuerpos HuMab anti-CD74

Para determinar si los anticuerpos HuMab anti-CD74 son adecuados para un enfoque conjugado anticuerpo fármaco, se estudió la internalización y la acumulación de anticuerpos por análisis FACS después de la incubación de diferentes anticuerpos HuMab anti-CD74 con células Daudi. Se sembraron 10⁵ células en placas de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos (Greiner bio-one). Se añadieron anticuerpos HuMab anti-CD74 marcados con Alexa-488 en diferentes puntos de tiempo y se incubaron a 4 °C (para medir la unión a CD74 expresado en superficie) o a 37 °C (para medir la unión y la internalización). La incubación total con el anticuerpo se indica debajo de las gráficas. La internalización y la acumulación a 37 °C también se estudió usando células Raji y M4A4 con una concentración final de 3 µg/ml de anticuerpos HuMab anti-CD74 marcados con Alexa-488. Después de la incubación con anticuerpo, las células se pusieron en hielo y las placas se lavaron dos veces con tampón FACS. Los anticuerpos marcados asociados a células se detectaron por Citometría de flujo en un FACS Canto II (BD Biosciences).

La Figura 15 muestra que solamente se detectaron bajos niveles de unión de anticuerpos HuMab anti-CD74 marcados con Alexa-488 a la superficie celular de Daudi después de la incubación a 4 °C en cualquier punto de tiempo. Por lo tanto, las intensidades de fluorescencia observadas medidas después de la incubación a 37 °C representan el anticuerpo internalizado. La Figura 15B muestra que los anticuerpos HuMab anti-CD74 ensayados se internalizaron, pero con diferentes efectividades. La internalización fue más rápida para HuMab-CD74-011, más lenta para HuMab-CD74-006 y la más lenta para HuMab-CD74-008. Lo mismo se observó para la internalización y la acumulación en células Raji (15C) y células M4A4 (15D).

Ejemplo 25

Tratamiento profiláctico de xenoinjertos de tumores Daudi en ratones SCID con anticuerpos HuMab anti CD74

La efectividad *in vivo* de los anticuerpos HuMab anti-CD74 se determinaron en un modelo de tumor de xenoinjerto Daudi intravenoso (i.v.) (linfoma de Burkitt) en ratones SCID. Las células Daudi se transfectaron por electroporación con el gen gWIZ de la luciferasa (Aldevron, Fargo, ND, USA) y el vector pPur (BD Biosciences, Alphen a/d Rijn, The Netherlands) en una relación 4:1. Después de 48 h, se añadió puromicina para la selección de un clon transfectado establemente (Daudi-luc). Las células Daudi-luc #1E3 se cultivaron en RPMI suplementado con suero de ternera cósmica 10 % (cat. n.º SH30087.04, Hyclone), 1 % de penicilina/estreptomicina (cat. n.º DE17-603, Cambrex, Alemania), 1 % de piruvato sódico y 1 µg/ml de puromicina (cat. n.º P-8833, Sigma, Zwijndrecht, Países Bajos). Se inyectaron $2,5 \times 10^6$ células de tumor luc Daudi en 100 µl de PBS i.v. en la vena de la cola de ratones SCID hembras (7 ratones por grupo). Los ratones se trataron el día de la inoculación del tumor con 100 µg (~5 mg/kg) HuMab-CD74-005, -006 o -011 o anticuerpo control (IgG 1 b12), en 200 µl de PBS, intraperitonealmente (i.p.). Los ratones se formaron imágenes directamente después de la inoculación del tumor, seguido de una formación de imágenes a intervalos semanales empezando el día 14. Para las imágenes, los ratones se anestesiaron usando isoflurano, seguido de administración intraperitoneal de 2,5 mg de D-luciferina (forma ácida, cat.no. BT11-1000; Biothema, Haninge, Suiza) en 200 µl 10 mg/ml TRIS (cat.no. T60666-1kg, Sigma). La formación de imagen de bioluminiscencia (BLI) desde el lado de la espalda (vista dorsal) empezó 10 min después de la administración de D-luciferina, 5 min de tiempo de exposición, en un Biospace Imager. Se hicieron las imágenes en blanco y negro para la referencia anatómica

La Figura 16 muestra que todos los anticuerpos HuMab anti-CD74 ensayados previnieron casi completamente el sobrecrecimiento de tumores Daudi luc i.v.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Genmab A/S

<120> ANTICUERPOS HUMANOS CONTRA CD74

<130> P68

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 296

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia parcial

<400> 1

ES 2 700 514 T3

Met His Arg Arg Arg Ser Arg Ser Cys Arg Glu Asp Gln Lys Pro Val
 1 5 10 15

Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met
 20 25 30

Leu Gly Arg Arg Pro Gly Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala
 35 40 45

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

Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys
 65 70 75 80

Leu Thr Val Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys
 85 90 95

Leu Pro Lys Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro
 100 105 110

Leu Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Pro Met
 115 120 125

Gln Asn Ala Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His
 130 135 140

Leu Leu Gln Asn Ala Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Gly
 145 150 155 160

Ser Phe Pro Glu Asn Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu Thr Ile

ES 2 700 514 T3

					165					170					175
Asp	Trp	Lys	Val	Phe	Glu	Ser	Trp	Met	His	His	Trp	Leu	Leu	Phe	Glu
			180					185					190		
Met	Ser	Arg	His	Ser	Leu	Glu	Gln	Lys	Pro	Thr	Asp	Ala	Pro	Pro	Lys
		195					200					205			
Val	Leu	Thr	Lys	Cys	Gln	Glu	Glu	Val	Ser	His	Ile	Pro	Ala	Val	His
	210					215					220				
Pro	Gly	Ser	Phe	Arg	Pro	Lys	Cys	Asp	Glu	Asn	Gly	Asn	Tyr	Leu	Pro
225					230					235					240
Leu	Gln	Cys	Tyr	Gly	Ser	Ile	Gly	Tyr	Cys	Trp	Cys	Val	Phe	Pro	Asn
				245					250						255
Gly	Thr	Glu	Val	Pro	Asn	Thr	Arg	Ser	Arg	Gly	His	His	Asn	Cys	Ser
			260					265						270	
Glu	Ser	Leu	Glu	Leu	Glu	Asp	Pro	Ser	Ser	Gly	Leu	Gly	Val	Thr	Lys
		275					280					285			
Gln	Asp	Leu	Gly	Pro	Val	Pro	Met								
	290						295								

<210> 2
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia parcial

10

<400> 2

ES 2 700 514 T3

Met His Arg Arg Arg Ser Arg Ser Cys Arg Glu Asp Gln Lys Pro Val
 1 5 10 15

Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met
 20 25 30

Leu Gly Arg Arg Pro Gly Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala
 35 40 45

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

Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys
 65 70 75 80

Leu Thr Val Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys
 85 90 95

Leu Pro Lys Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro
 100 105 110

Leu Leu Met Gln Ala Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Pro Met
 115 120 125

Gln Asn Ala Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His
 130 135 140

Leu Leu Gln Asn Ala Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Gly
 145 150 155 160

Ser Phe Pro Glu Asn Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu Thr Ile
 165 170 175

Asp Trp Lys Val Phe Glu Ser Trp Met His His Trp Leu Leu Phe Glu
 180 185 190

Met Ser Arg His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro Pro Lys
 195 200 205

Glu Ser Leu Glu Leu Glu Asp Pro Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Lys
 210 215 220

Gln Asp Leu Gly Pro Val Pro Met
 225 230

<210> 3
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 700 514 T3

<220>

<223> Secuencia parcial

<400> 3

5

Met Pro Gly Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala Leu Tyr Thr
1 5 10 15

Gly Phe Ser Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala Thr Thr
20 25 30

Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr Val
35 40 45

ES 2 700 514 T3

Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys Leu Pro Lys
 50 55 60

Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro Leu Leu Met
 65 70 75 80

Gln Ala Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Pro Met Gln Asn Ala
 85 90 95

Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His Leu Leu Gln
 100 105 110

Asn Ala Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Gly Ser Phe Pro
 115 120 125

Glu Asn Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu Thr Ile Asp Trp Lys
 130 135 140

Val Phe Glu Ser Trp Met His His Trp Leu Leu Phe Glu Met Ser Arg
 145 150 155 160

His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro Pro Lys Val Leu Thr
 165 170 175

Lys Cys Gln Glu Glu Val Ser His Ile Pro Ala Val His Pro Gly Ser
 180 185 190

Phe Arg Pro Lys Cys Asp Glu Asn Gly Asn Tyr Leu Pro Leu Gln Cys
 195 200 205

Tyr Gly Ser Ile Gly Tyr Cys Trp Cys Val Phe Pro Asn Gly Thr Glu
 210 215 220

Val Pro Asn Thr Arg Ser Arg Gly His His Asn Cys Ser Glu Ser Leu
 225 230 235 240

Glu Leu Glu Asp Pro Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Lys Gln Asp Leu
 245 250 255

Gly Pro Val Pro Met
 260

<210> 4
 <211> 197
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia parcial

ES 2 700 514 T3

<400> 4

```

Met Pro Gly Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala Leu Tyr Thr
1           5           10           15

Gly Phe Ser Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln Ala Thr Thr
          20           25           30

Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr Val
          35           40           45

Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys Leu Pro Lys
          50           55           60

Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro Leu Leu Met
65           70           75           80

Gln Ala Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Pro Met Gln Asn Ala
          85           90           95

Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His Leu Leu Gln
          100          105          110

Asn Ala Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Gly Ser Phe Pro
          115          120          125

Glu Asn Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu Thr Ile Asp Trp Lys
130          135          140

Val Phe Glu Ser Trp Met His His Trp Leu Leu Phe Glu Met Ser Arg
145          150          155          160

His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro Pro Lys Glu Ser Leu
          165          170          175

Glu Leu Glu Asp Pro Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Lys Gln Asp Leu
          180          185          190

Gly Pro Val Pro Met
          195

```

5 <210> 5
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia parcial con etiqueta His

<400> 5

ES 2 700 514 T3

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

<210> 6
 <211> 166
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

ES 2 700 514 T3

<220>

<223> Secuencia parcial con etiqueta His

<400> 6

5

```

His His His His His His Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys Leu Thr
1           5           10           15

Val Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys Leu Pro
20           25           30

Lys Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Met Arg Met Ala Thr Pro Leu Leu
35           40           45

Met Gln Ala Leu Pro Met Gly Ala Leu Pro Gln Gly Pro Met Gln Asn
50           55           60

Ala Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His Leu Leu
65           70           75           80

Gln Asn Ala Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Gly Ser Phe
85           90

Pro Glu Asn Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu Thr Ile Asp Trp
100          105          110

Lys Val Phe Glu Ser Trp Met His His Trp Leu Leu Phe Glu Met Ser
115          120          125

Arg His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro Pro Lys Glu Ser
130          135          140

Leu Glu Leu Glu Asp Pro Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Lys Gln Asp
145          150          155          160

Leu Gly Pro Val Pro Met
165
    
```

<210> 7

<211> 124

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

10

```

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

15

ES 2 700 514 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser 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 Tyr Asp Gly Ser 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 Ser Gly Arg Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Ser Tyr Phe Asp
 100 105 110

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

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

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 9
 <211> 8
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

<210> 10
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

Ala Ser Gly Arg Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Ser Ser Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

Tyr

30

ES 2 700 514 T3

<210> 11
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 11

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 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser 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 Tyr Asp Gly Ser Ile 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 Val Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Arg Glu Ile Thr Ser Gln Asn Ile Val Ile Leu Leu Asp
 100 105 110
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Thr Ser
 115 120

10 <210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 12

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

20 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 13

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys
 1 5

<210> 14
 <211> 17

ES 2 700 514 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

5

Ala Arg Gly Arg Glu Ile Thr Ser Gln Asn Ile Val Ile Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Tyr

<210> 15
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 15

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 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser 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 Tyr Asp Gly Ser 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 Gly Arg Glu Ile Thr Ser Gln Asn Ile Val Ile Leu Leu Asp
 100 105 110

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

15

<210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 16

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

25

<210> 17

ES 2 700 514 T3

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

5 <400> 17

Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
 1 5

10 <210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 18

Ala Arg Gly Arg Glu Ile Thr Ser Gln Asn Ile Val Ile Leu Leu Asp
 1 5 10 15

Tyr

20 <210> 19
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

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 Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser 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 Gly Gly Thr Leu Val Arg Gly Ala Met Tyr Gly Thr Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

25

ES 2 700 514 T3

5 <210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

10 <210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
15 <400> 21

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

20 <210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
25 <400> 22

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

30 <210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 23

ES 2 700 514 T3

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 Phe 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

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

<210> 24
 <211> 6
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 24

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 1 5

<210> 25
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 25

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 26
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 26

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une a las variantes 1 y 2 de CD74, que comprende:
 - 5 (a) una región V_H que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 y una región V_L que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 **[011]**;
 - (b) una región V_H que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 y una región V_L que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 23 **[005]**; o
 - 10 (c) una región V_H que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 y una región V_L que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26 **[006]**.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal humano.
3. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene un isotipo seleccionado de IgG1 e IgG4.
4. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que está conjugado a un resto terapéutico.
5. El anticuerpo de la reivindicación 4, que está conjugado al resto terapéutico a través de un conector fijado a los restos sulfhidrilo en el anticuerpo, obtenido mediante una reducción al menos parcial del anticuerpo.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 4 y 5, en donde el resto terapéutico es un resto citotóxico, un radioisótopo, un agente quimioterapéutico, un péptido lítico o una citocina.
- 25 7. El anticuerpo de la reivindicación 6, que está conjugado a un resto citotóxico.
8. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde el resto citotóxico se selecciona del grupo que consiste en taxol; citocalasina B; gramicidina D; bromuro de etidio; emetina; mitomicina; etopósido; tenopósido; vincristina; vinblastina; colchicina; doxorubicina; daunorubicina; dihidroxi antracina diona; maitansina o un análogo o derivado de la misma; una auristatina o un análogo de péptido funcional o derivado del mismo; dolastina 10 o 15 o un análogo de la misma; irinotecano o un análogo del mismo; mitoxantrona; mitramicina; actinomicina D; 1-deshidrotestosterona; un glucocorticoide; procaína; tetracaína; lidocaína; propanolol; puromicina; calicheamicina o un análogo o derivado de la misma; un antimetabolito tal como metotrexato, 6 mercaptopurina, 6 tioguanina, citarabina, fludarabina, 5 fluorouracilo, decarbazina, hidroxiurea, asparaginasa, gemcitabina o cladribina; un agente alquilante tal como mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptoizocina, dacarbacina (DTIC), procarbina, mitomicina C; un derivado de platino tal como cisplatina o carboplatina; duocarmicina A, duocarmicina SA, raquelmicina (CC-1065) o un análogo o derivado de los mismos; un antibiótico tal como dactinomicina, bleomicina, daunorubicina, doxorubicina, idarubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramycin (AMC)); pirrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepinas (PDB); toxina diftérica y moléculas relacionadas tales como la cadena A diftérica y fragmentos activos de las mismas y moléculas híbridas, toxina ricina tal como ricina A o una toxina de la cadena de ricina A descglucosilada, toxina colérica, una toxina tipo Shiga tal como SLT I, SLT II, SLT IIV, toxina KT, toxina C3, toxina Shiga, toxina pertussis, toxina tetánica, inhibidor de la proteasa Bowman-Birk de soja, 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* tales como PAPI, PAPII y PAP-S, inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, toxinas gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina y enomicina; ribonucleasa (RNasa); DNasa I, enterotoxina A estafilocócica; proteína antivírica de fitolaca; toxina difterina; y endotoxina de *Pseudomonas*.
- 30 45 50 9. El anticuerpo de la reivindicación 7, que se conjuga a un resto citotóxico seleccionado del grupo que consiste en una antraciclina, una pirrolo[2,1][1,4]-benzodiazepina, maitansina, calicheamicina, duocarmicina, raquelmicina (CC-1065), dolastatina 10 o 15 e irinotecano.
10. El anticuerpo de la reivindicación 7, en donde el resto citotóxico es una auristatina o un análogo peptídico funcional o un derivado de los mismos, opcionalmente conjugado al anticuerpo a través de un conector fijado a uno o más restos cisteína en el anticuerpo.
- 55 60 11. El anticuerpo de la reivindicación 6, que está conjugado a 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 α , IFN β , IFN γ , GM-CSF, CD40L, ligando Flt3, factor de células madre, ancestim y TNF α .
- 65 12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo multiespecífico, que comprende una primera región de unión a antígeno de un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y al menos una segunda región de antígeno que tiene una especificidad de unión diferente.

13. El anticuerpo de la reivindicación 12, que es un anticuerpo biespecífico, opcionalmente en donde la segunda región de unión a antígeno tiene especificidad de unión por un antígeno sobre una célula efectora humana.
- 5 14. El anticuerpo de la reivindicación 13, en donde la célula efectora humana es una célula T.
- 10 15. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, que es un anticuerpo biespecífico en donde la primera región de unión a antígeno está enlazada a una primera región Fc que tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en 366, 368, 370, 399, 405, 407 y 409 y la segunda región de unión a antígeno está enlazada a una segunda región Fc que tiene una sustitución de aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en 366, 368, 370, 399, 405, 407 y 409 y la primera y la segunda regiones Fc no están sustituidas en las mismas posiciones.
- 15 16. Un anticuerpo anti-idiotípico contra el anticuerpo de cualquier reivindicación anterior.
- 20 17. Un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26; o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23; o una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26.
- 25 18. Un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 17, que comprende además una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de una cadena ligera de anticuerpo humano, de una cadena pesada de anticuerpo humano o ambas.
- 30 19. Una célula hospedadora eucariota o procariota recombinante que produce el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 35 20. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 21. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso como un medicamento.
- 45 22. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 50 23. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su uso en profilaxis de cáncer.
- 55 24. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 23, en donde la profilaxis de cáncer comprende uno o más de reducir el riesgo de desarrollar cáncer, reducir el riesgo del avance del cáncer y/o reducir el riesgo de reaparición de un cáncer en remisión.
- 60 25. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en donde el cáncer se selecciona el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio/cervical, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, glioma maligno, melanoma maligno, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer hepático, cáncer de timo, histiosarcoma fibroso maligno, schwannoma acústico, adenoma pituitario, un adenoma, linfoma maligno, leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), leucemia mieloide crónica (CML) en fase blasto, linfoma no Hodgkiniano (NHL), mieloma múltiple (MM), linfoma de células B monocitoide (MBCL), leucemia de células pilosas (HCL) y linfoma de células T.
- 65 26. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 25 para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune.
27. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26 en combinación con al menos un agente terapéutico adicional.
28. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 27, en donde al menos un agente terapéutico adicional se selecciona de un segundo anticuerpo o ADC; un agente quimioterapéutico; un inhibidor de la angiogénesis, de la neovascularización y/o otra vascularización; un inmunógeno anti-cáncer; una citocina o quimiocina; un control del ciclo celular o un regulador de la apoptosis; un agente regulador hormonal; un agente anti-anérgico; un ácido nucleico o un vector que contiene un gen supresor de tumores; un ácido nucleico anti-cáncer; un virus o proteínas víricas; células del sistema inmune; un agente inductor de la diferenciación; un agente de regulación positiva de CD74; y un agente anti-inflamatorio, inmunosupresor y/o inmunomodulatorio; o una combinación de cualquiera de los mismos.
29. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 27, en donde al menos un agente terapéutico se selecciona de un anticuerpo específico de CD20, un anticuerpo específico de CD138, un anticuerpo específico de CD38, un anticuerpo anti-VEGF-A, melfalano, lenalidomida, bortezomib, fluorouracilo, gemcitabina, irinotecano o cisplatina.

30. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 14 para su uso induciendo la muerte celular, inhibiendo el crecimiento y/o inhibiendo la proliferación de una célula que expresa CD74.

Figura 1

a) CD74v1 (296 aa; SEQ ID NO:1)

```

1 mhrrrsrscr edqkpvmdqg rdlisnneql pmlgrrpgap eskcsrgaly
51 tgfsilvtll lagqattayf lyqqqgrldk ltvtsqnlql enlrmlkpkp
101 pkpvskmrma tpilmqalpm galpqqgpmqn atkygnmte d hvmhllqnad
151 plkvypplkg sfpnlrhk ntmetidwkv feswmhhlwll femsrhsleq
201 kptdappkvl tkcqeeshi pavhpgsfrp kcdengnylp lqcygsigyc
251 wcvfpngtev pntrsrghhn csesleledp ssglgvttkqd lgpvpm

```

b) CD74v2 (232 aa; SEQ ID NO:2)

```

1 mhrrrsrscr edqkpvmdqg rdlisnneql pmlgrrpgap eskcsrgaly
51 tgfsilvtll lagqattayf lyqqqgrldk ltvtsqnlql enlrmlkpkp
101 pkpvskmrma tpilmqalpm galpqqgpmqn atkygnmte d hvmhllqnad
151 plkvypplkg sfpnlrhk ntmetidwkv feswmhhlwll femsrhsleq
201 kptdappkes leledpssgl gvtkqdlgpv pm

```

c) CD74v1del2-36 (261 aa; SEQ ID NO:3)

```

1 mpgapeskcs rgalytgfsi lvtlllagqa ttayflyqqg grldkltvts
51 qnlqlenlrm klpkppkpv s kmrmatpllm galpmpgalp gpmqnatkyg
101 nmtedhvmhl lqnadplkvy pplkgsfpen lrhikntmet idwkvfeswm
151 hhwllfemsr hsleqkptda ppkvltkcqe evshipavhp gsfrpkcde n
201 gnylplqcyg sigycwcvfp ngtevpntrs rghhncsesl eledpssglg
251 vtkqdlgpvp m

```

d) CD74v2del2-36 (197 aa; SEQ ID NO:4)

```

1 mpgapeskcs rgalytgfsi lvtlllagqa ttayflyqqg grldkltvts
51 qnlqlenlrm klpkppkpv s kmrmatpllm galpmpgalp gpmqnatkyg
101 nmtedhvmhl lqnadplkvy pplkgsfpen lrhikntmet idwkvfeswm
151 hhwllfemsr hsleqkptda ppkesleled pssglgvtkq dlgpvpm

```

e) HisCD74v1 (230 aa; SEQ ID NO:5)

```

1 hhhhhhqqqg rldkltvtsq nlqlenlrmk lpkppkpvsk mrmatpllmq
51 alpmgalpqq pmqnatkygn mtedhvmhll qnadplkvyp plkgsfpenl
101 rhikntmeti dwkvfeswmh hwwllfemsrh sleqkptdap pkvltkcqe
151 vshipavhpg sfrpkcdeng nylplqcygs igycwcvfpn gtevpntrsr
201 ghhncsesle ledpssglgv tkqdlgpvpm

```

f) HisCD74v2 (166 aa; SEQ ID NO:6)

```

1 hhhhhhqqqg rldkltvtsq nlqlenlrmk lpkppkpvsk mrmatpllmq
51 alpmgalpqq pmqnatkygn mtedhvmhll qnadplkvyp plkgsfpenl
101 rhikntmeti dwkvfeswmh hwwllfemsrh sleqkptdap pkesleledp
151 ssglgvttkqd lgpvpm

```

Figura 2

a) VH:

```

|--CDR1--|          |--CDR2--|          |-----CDR3-----|
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVTISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTIYLQMNSLRAEDTAVYVCASGRYYGSGSYSSYFDYWGQGTLVTVSS (7)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVTISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTIYLQMNSLRAEDTAVYCARGREITSONIVILLDDYWGCGTLLVTVTS (11)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVTISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTIYLQMNSLRAEDTAVYCARGREITSONIVILLDDYWGCGTLLVTVSS (15)
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPDKGLEWVAVTISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTIYLQMNSLRAEDTAVYVCARGGTLVRG-AMYGTDYWGCGTLLVTVSS (19)

```

b) VL:

```

|--CDR1--|          CDR2          |-----CDR3-----|
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAWFQQKPEKAPKSLIYAASLSQSGVPSRFRSGSGGTFDTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPIITFGGGTKVEIK VL2013-005 (23)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAWFQQKPEKAPKSLIYAASLSQSGVPSRFRSGSGGTFDTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPIITFGGGTKVEIK VL2013-006 (26)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAWFQQKPEKAPKSLIYAASLSQSGVPSRFRSGSGGTFDTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPIITFGGGTKVEIK VL2013-008 (26)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQGISWLAWFQQKPEKAPKSLIYAASLSQSGVPSRFRSGSGGTFDTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPIITFGGGTKVEIK VL2013-011 (26)

```

Figura 3

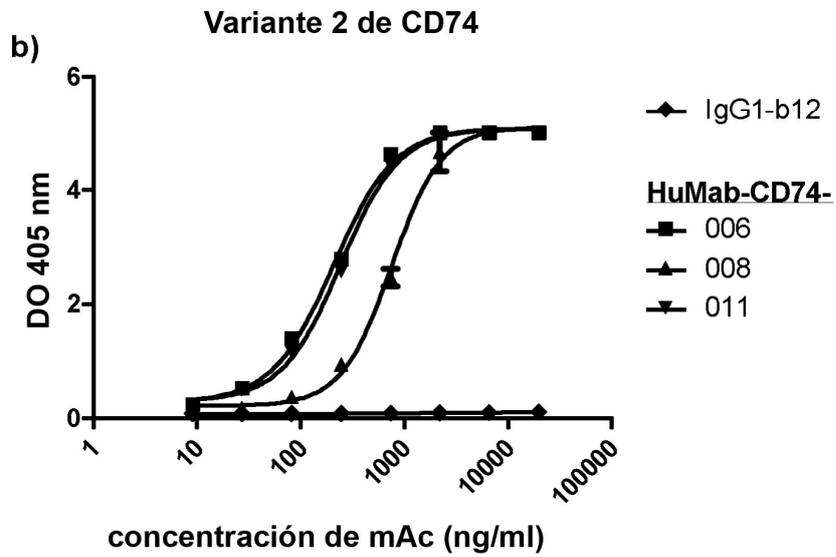
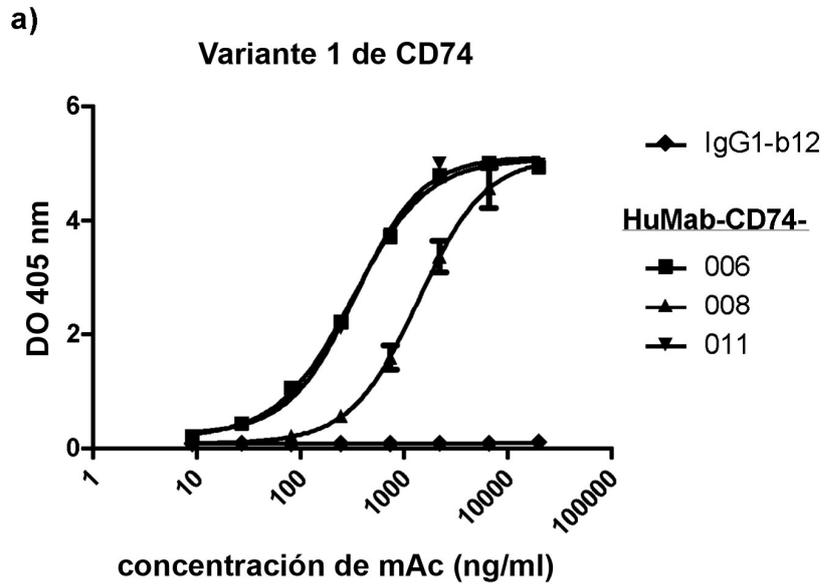


Figura 4

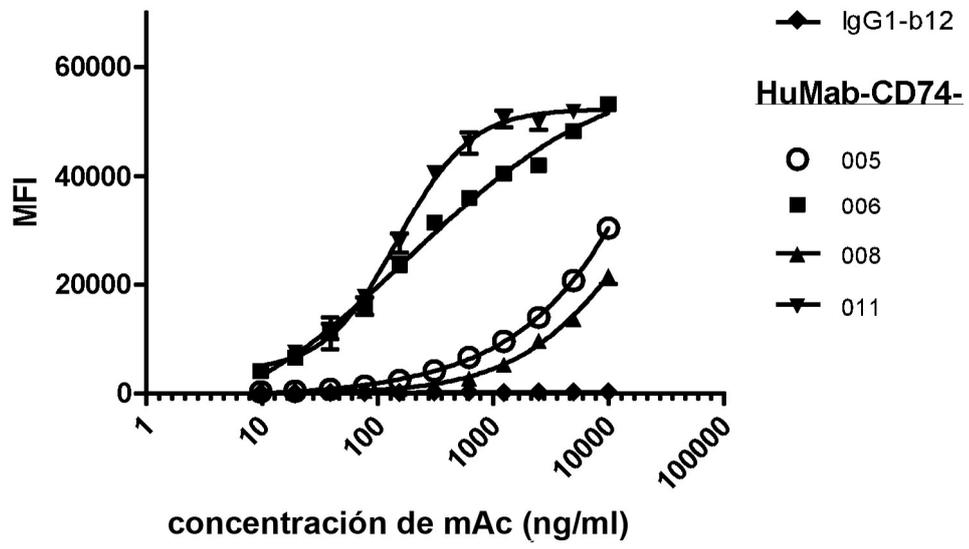


Figura 5

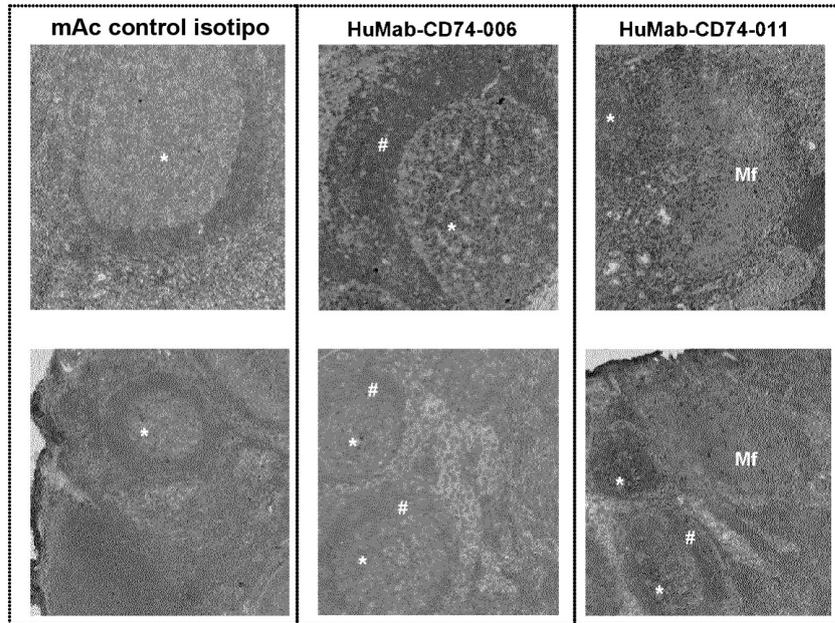


Figura 6

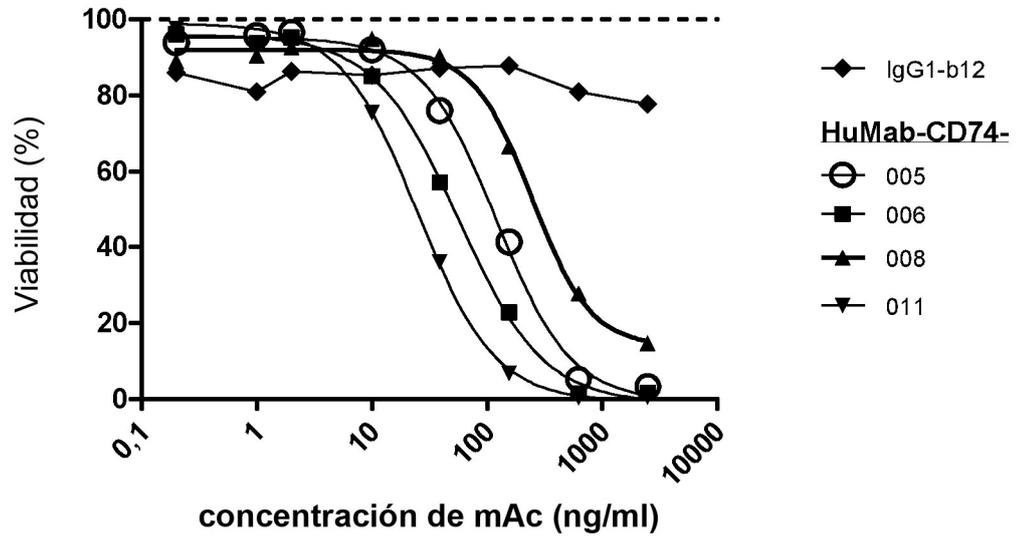
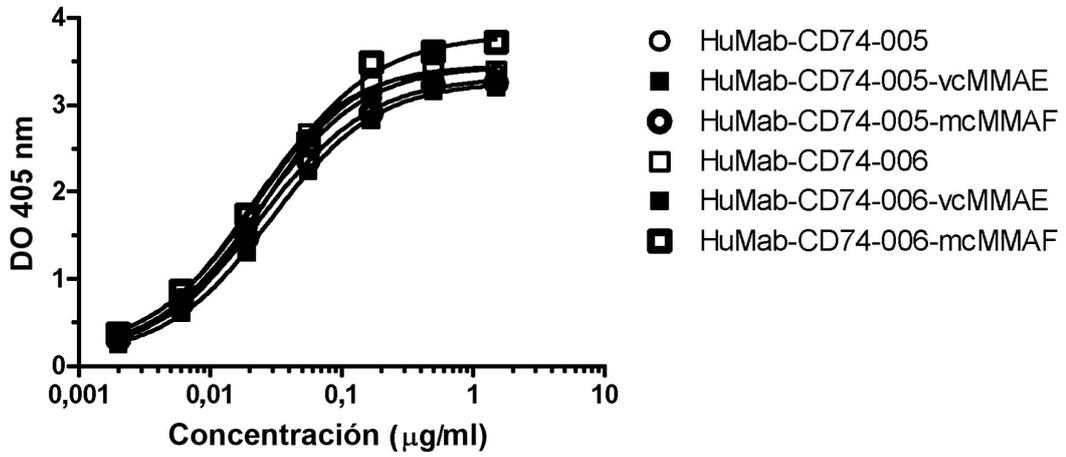


Figura 7

A



B

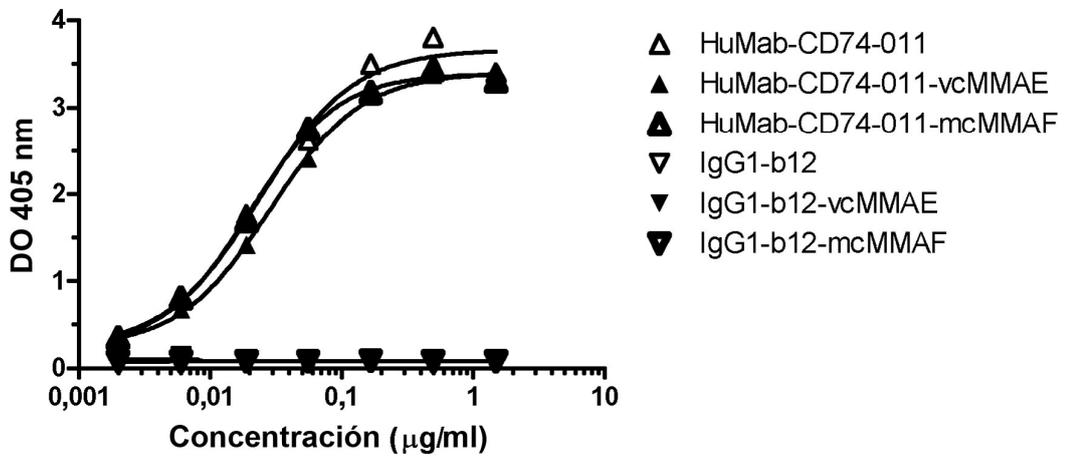
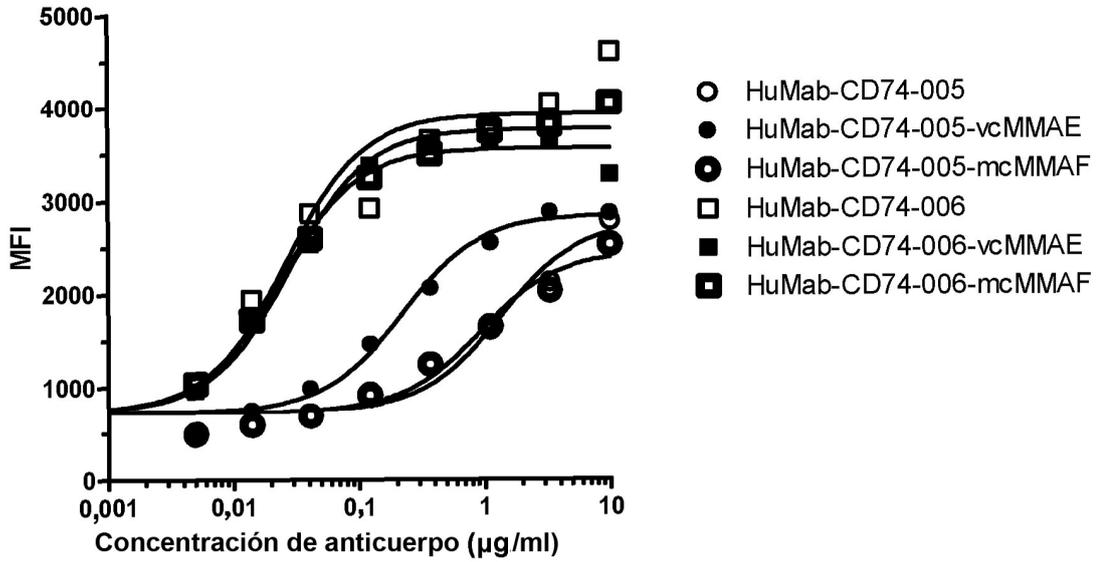


Figura 8

A



B

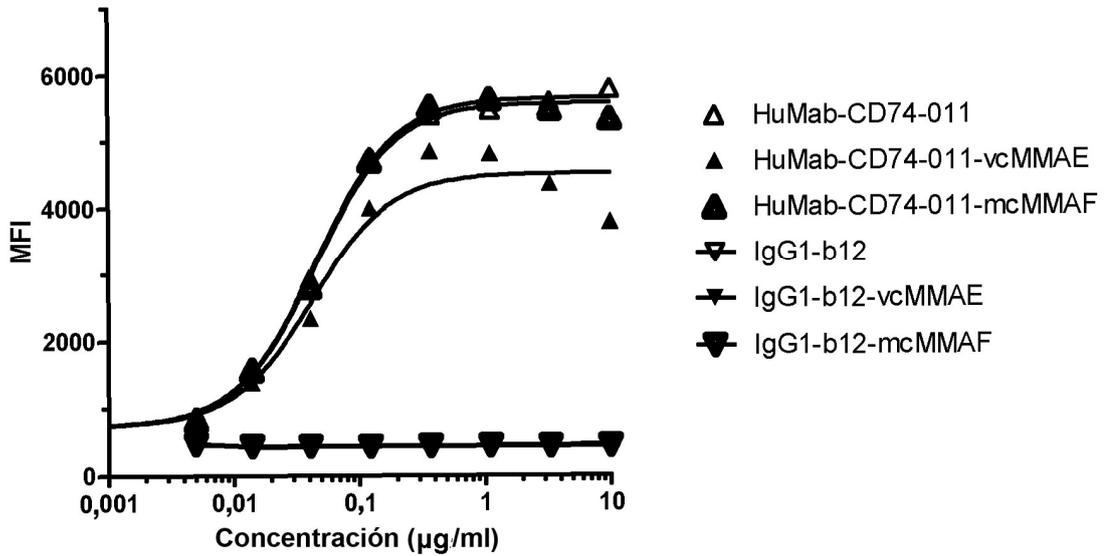


Figura 9

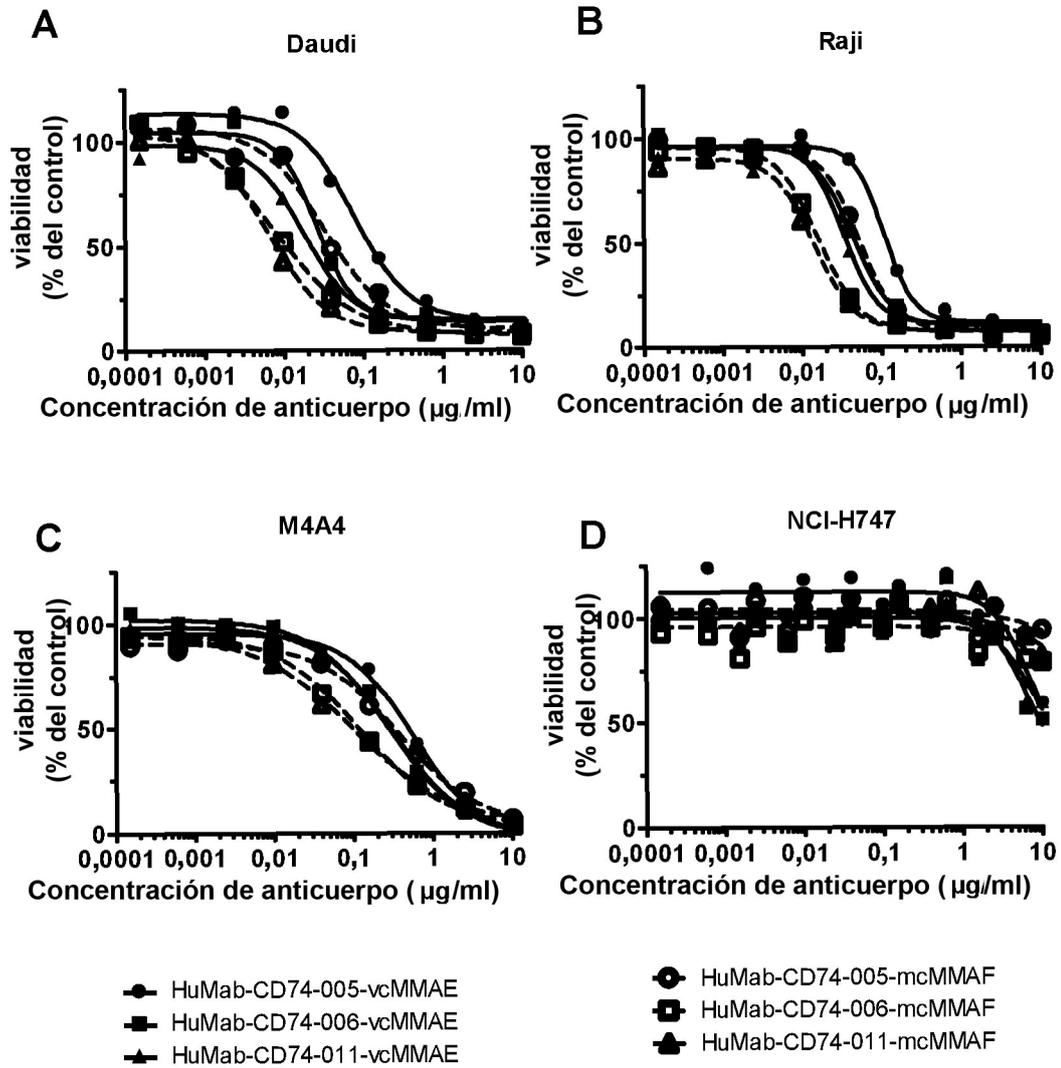


Figura 10

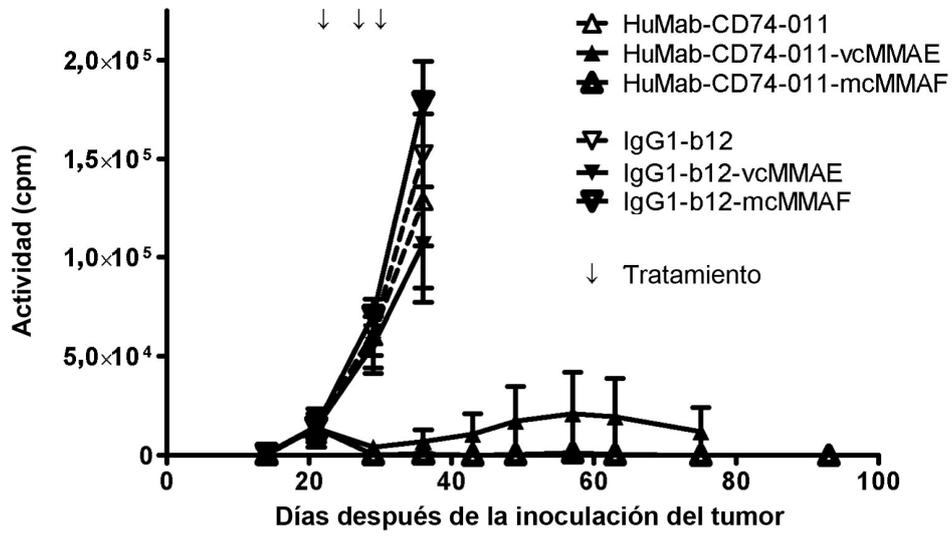


Figura 11

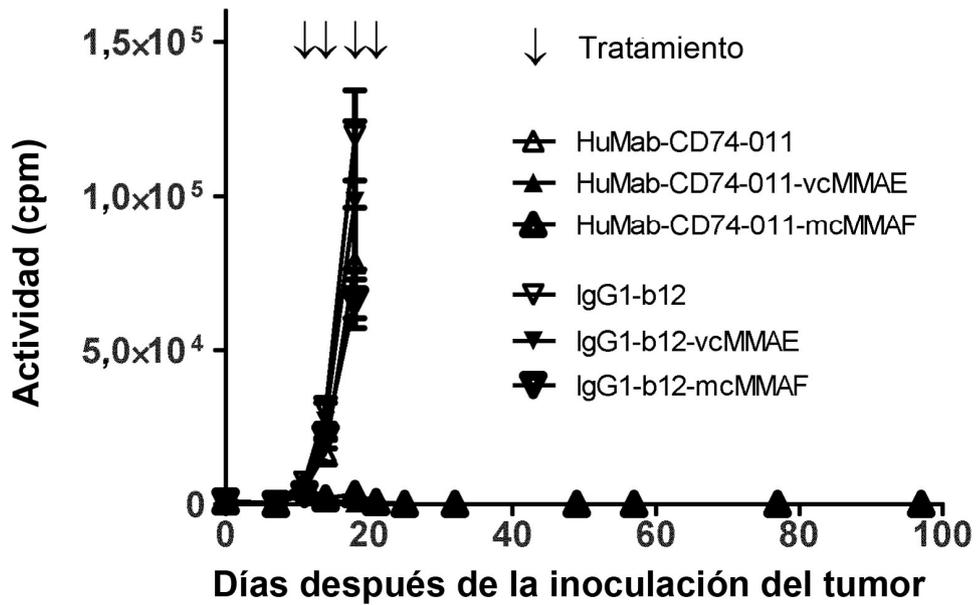


Figura 12

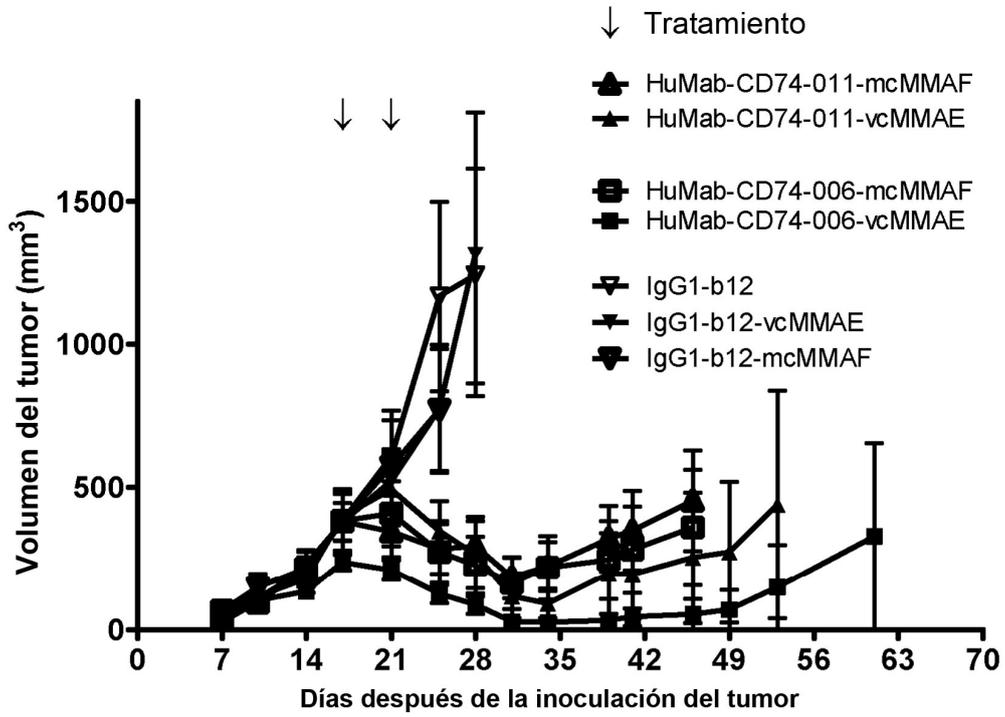


Figura 13

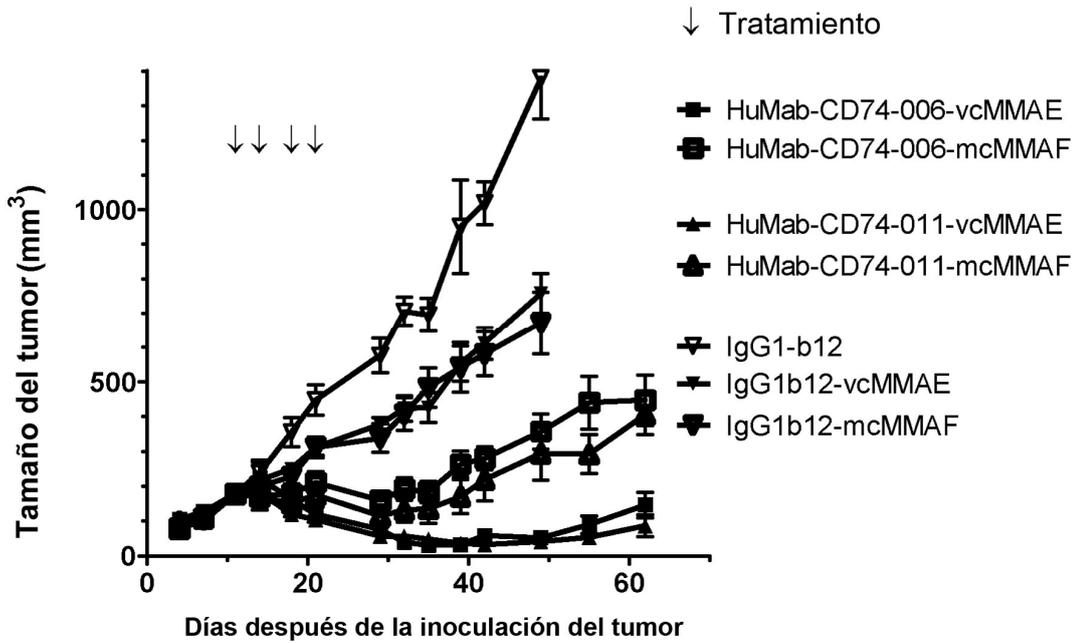


Figura 14

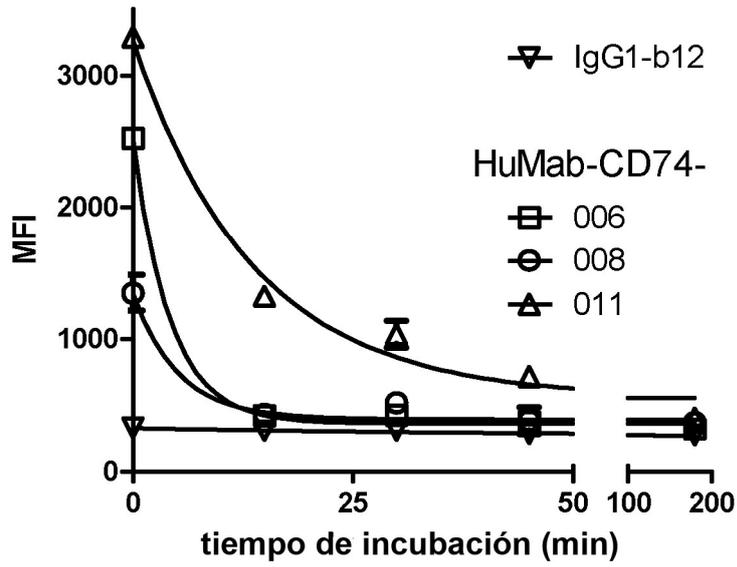


Figura 16

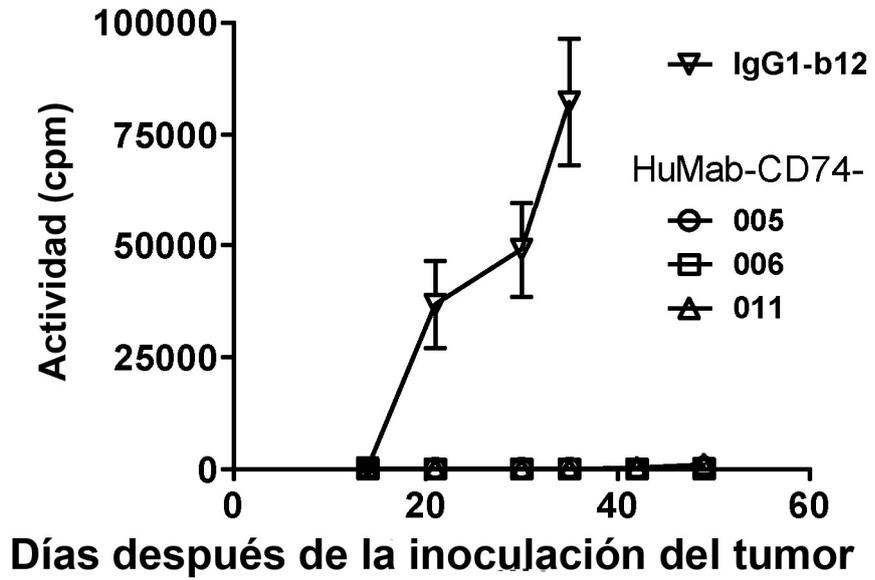


Figura 15

