

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 925**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2007 PCT/US2007/075120**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2008 WO08112004**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2007 E 07873972 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2064244**

54 Título: **Anticuerpos dirigidos hacia alfaVbeta6 y uso de los mismos**

30 Prioridad:

03.08.2006 US 835559 P

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

09.03.2020

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building Granta Park
Cambridge CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

**FOLTZ, IAN;
RINKENBERGER, JULIE;
ALFRED, AVRIL;
BARRY, SIMON THOMAS y
BEDIAN, VAHE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 746 925 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 dirigidos hacia alfaVbeta6 y uso de los mismos

Campo

5 Esta divulgación se relaciona a los anticuerpos monoclonales contra la integrina alfaVbeta6 ($\alpha V\beta 6$) y uso de tales anticuerpos. También en la presente se describen anticuerpos monoclonales que son completamente humanos y están dirigidos hacia $\alpha V\beta 6$. Los anticuerpos descritos son útiles como diagnósticos y para el tratamiento de enfermedades asociadas con la actividad y/o la sobreproducción de $\alpha V\beta 6$.

Antecedentes

10 La superfamilia de las integrinas incluye a al menos 24 miembros de la familia que consisten en heterodímeros que utilizan 18 cadenas alfa y 8 cadenas beta (Hynes, (2002) Cell 110: 673-87). Esta familia de receptores se expresa en la superficie celular y media las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular que regulan la supervivencia, la proliferación, la migración y la diferenciación celular, así como la invasión tumoral y la metástasis (French-Constant and Colognato, (2004) Trends Cell Biol. 14: 678-86). Las integrinas se unen a otros receptores celulares, factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular, con muchos miembros de la familia que tienen una especificidad de unión superpuesta para las proteínas particulares. Esta redundancia podría asegurar que las funciones importantes continúen en ausencia de una integrina en particular (Koivisto et al., (2000) Exp. Cell Res. 255: 10-17). Sin embargo, también se ha reportado la restricción temporal y espacial de la expresión de integrinas individuales con especificidad similar y pueden alterar la respuesta celular a la unión del ligando (Yokosaki et al., (1996) J. Biol. Chem. 271: 24144-50; Kemperman et al., (1997) Exp. Cell Res. 234: 156-64; Thomas et al., (2006) J. Oral Pathol. Med. 35: 1-10).

20 La familia de integrinas se puede dividir en varias subfamilias en función de la especificidad de ligando de los heterodímeros. Una subfamilia está compuesta por todas las integrinas que reconocen y se unen al tripéptido RGD. Estos receptores incluyen los $\alpha IIb\beta 3$ y todos los heterodímeros de αV (Thomas et al., (2006) J. Oral Pathol. Med. 35: 1-10). Mientras que la cadena αV puede aparearse con 5 cadenas beta conocidas, varias de estas cadenas beta solamente pueden aparearse con αV . La cadena $\beta 6$ es selectiva para la heterodimerización a αV y este par se une a la matriz extracelular y proteínas de citocinas y con afinidad que puede ser alta o baja. $\alpha V\beta 6$ se une a los motivos RGD en los complejos latentes tanto TGF β 1LAP como TGF β 3LAP y activa a ambos (Munger et al., (1999) Cell 96: 319-328; Annes et al., (2002) FEBS Letters 511: 65-68). Sin embargo, no se une ni activa a TGF β 2LAP, que no tiene a el tripéptido (Ludbrook et al., (2003) Biochem. J. 369: 311-18). La activación de TGF β mediada por $\alpha V\beta 6$ requiere la proteína 1 de unión a TGF β latente (LTBP1), la cual ata al complejo de TGF β latente a la matriz extracelular. Se propone que la activación resulta de un cambio de conformación inducido cuando el TGF β LAP se mantiene entre la célula y la matriz mediante $\alpha V\beta 6$ y LTBP1, respectivamente (Keski-Oja et al., (2004) Trends Cell Biol. 14: 657-659; Annes et al. al., (2004) J. Cell Biol. 165: 723-34). La afinidad de unión pMolar de $\alpha V\beta 6$ a los complejos TGF β LAP es la más alta para cualquiera de sus ligandos conocidos. Otros ligandos para $\alpha V\beta 6$ incluyen a la fibronectina, tenascina, vitronectina y osteopontina (Busk et al., (1992) J. Biol. Chem. 267: 5790-6; Prieto et al., (1993) PNAS 90: 10154-8; Huang et al., (1998) J. Cell. Sci. 111 (Pt 15): 2189-95; Yokosaki et al., (2005) Matrix Biol. 24: 418-27). La afinidad de unión de $\alpha V\beta 6$ para estas proteínas de la matriz extracelular es de baja afinidad y es en el intervalo de nMolar.

40 La expresión de la integrina $\alpha V\beta 6$ está restringida a las áreas de remodelación de tejido activo en el adulto, específicamente en los epitelios de heridas que están sanando y en el borde de tumores invasores (Breuss et al., (1995) J. Cell Sci. 108: 2241-51). Los queratinocitos en el borde de la herida aumentan la expresión de $\alpha V\beta 6$ durante su migración hacia la herida, pero la expresión permanece alta después de que los bordes del epitelio de la herida se han unido (Breuss et al., (1995) J. Cell Sci. 108: 2241-51; Haapasalmi et al., (1996) J. Invest. Dermatol. 106: 42-48). La matriz extracelular de la herida contiene fibronectina, tenascina y vitronectina, todas ellas son ligandos para $\alpha V\beta 6$ (Busk y otros, (1992) J. Biol. Chem. 267: 5790-6; Koivisto et al, (1999) Cell Adhes. Commun. 7: 245-57; Hakkinen et al., (2000) J. Histochem. Cytochem. 48: 985-98). Adicionalmente, $\alpha V\beta 6$ regula positivamente la expresión de la metaloproteinasas de matriz, MMP-9, que es capaz de degradar a el colágeno Tipo IV y promover el movimiento celular (Niu et al., (1998) Biochem. Biophys. Res. Com. 249: 287-91; Agrez et al., (1999) Int. J. Can. 81: 90-97; Thomas et al., (2001) Int. J. Cancer 92: 641-50; Gu et al., (2002) Br. J. Can. 87: 348-51). Basándose en su patrón de expresión en heridas y en estudios *in vitro*, $\alpha V\beta 6$ puede tener funciones duales para promover la migración de queratinocitos durante el cierre de la herida y posteriormente resolver la herida mediante la activación de TGF β . La activación de TGF β por medio de $\alpha V\beta 6$ contribuiría a la resolución de la herida mediante la regulación de la re-epitelización, la supresión de la inflamación y la promoción de la regeneración del tejido conectivo y la formación de cicatrices (Thomas et al., (2006) J. Oral Pathol. Med. 35: 1-10). Los estudios *in vivo* de heridas con ratones beta 6 nulos indicaron que las heridas se curaron, pero hubo una respuesta inflamatoria notablemente aumentada en la piel. El cierre de la herida y la actividad de los queratinocitos probablemente no se vieron afectados por la pérdida de $\alpha V\beta 6$ debido a la expresión de otros miembros de la familia de integrinas (Huang et al., (1996) J. Cell Biol. 133: 921-8). El infiltrado inflamatorio en las heridas en los ratones beta 6 nulos se asemejaba a aquellas de los ratones nulos en TGF β 1, lo que sugiere que la citosina no tenía la suficiente actividad para suprimir la respuesta inmune en ausencia de $\alpha V\beta 6$ (Shull et al., (1992) Nature 359: 693-9; Thomas et al., (2006) J. Oral Pathol. Med. 35: 1-10).

El análisis de los ratones beta 6 nulos en modelos de lesión pulmonar y enfermedad renal también ha identificado un papel para $\alpha V\beta 6$ en la fibrosis. La fibrosis pulmonar en los ratones beta 6 nulos se inhibió en un modelo de lesión por bleomicina (Munger et al., (1999) Cell 96: 319-328). Estos animales también fueron protegidos de un fenotipo similar a un tipo de enfisema dependiente de MMP12 (Morris et al., (2003) Nature 422: 169-73). Ambos fenotipos de la enfermedad son dependientes de la activación de TGF β (Munger et al., (1999) Cell 96: 319-328). La inhibición de la activación del TGF β mediada por la integrina $\alpha V\beta 6$ también se formuló la hipótesis de que era capaz de promover el edema pulmonar en la respuesta de la fase temprana a la lesión pulmonar aguda (Pittet et al., (2001) J. Clin. Invest. 107: 1537-44). Los ratones beta 6 nulos también estaban protegidos de la fibrosis en un modelo de enfermedad renal, donde la activación de TGF β es esencial para el desarrollo de lesiones fibróticas tubulointersticiales (Ma et al., (2003) Am. J. Pathol. 63: 1261-73).

Además de su expresión en la cicatrización de las heridas, la integrina $\alpha V\beta 6$ está regulada positivamente en la periferia de muchos tumores humanos. La expresión de $\alpha V\beta 6$ se ha reportado (Breuss et al., (1995) J. Cell Sci. 108: 2241-51; Jones et al., (1997) J. Oral Pathol. Med. 26: 63-8; Hamidi et al., (2000) Br. J. Cancer 82: 1433-40; Regezi et al., (2002) Oral Oncology 38: 332-6; Impola et al., (2004) J. Pathol. 202: 14-22) en carcinomas orales y de células escamosas de la piel, así como carcinomas de pulmón (Smythe et al., (1995) Can. Met. Rev. 14: 229-39), mama (Arihiro et al., (2000) Breast Can. 7: 19-26), páncreas (Sipos, et al., (2004) Histopathology 45: 226-36), estómago (Kawashima et al., (2003) Pathol. Res. Pract. 199: 57-64), colon (Bates et al., (2005) J. Clin. Invest. 115: 339-47), ovario (Ahmed et al., (2002) Carcinogenesis 23: 237-44; Ahmed et al., (2002) J. Histochem. Cytochem 50: 1371-79), y glándulas salivales (Westernoff et al., (2005) Oral Oncology 41: 170-74). En muchos de estos reportes, la expresión de $\alpha V\beta 6$ se correlaciona con el aumento del grado del tumor (Ahmed et al., (2002) J. Histochem. Cytochem. 50: 1371-79; Arihiro et al., (2000) Breast Can. 7: 19-26), metástasis eventuales a los ganglios linfáticos (Kawashima et al., (2003) Pathol. Res. Pract. 199: 57-64; Bates et al., (2005) J. Clin. Invest. 115: 339-47), o mal pronóstico (Bates et al., (2005) J. Clin. Invest. 115: 339-47). El tipo de tumor mejor estudiado es el carcinoma oral de células escamosas, donde los investigadores también han examinado a $\alpha V\beta 6$ en las lesiones precancerosas y correlacionaron su expresión con la progresión a la malignidad (Hamidi et al., (2000) Br. J. Cancer 82: 1433-40). El vínculo entre la expresión de $\alpha V\beta 6$ y la progresión tumoral también se ha investigado en el carcinoma de colon, donde la presencia de la integrina se correlaciona con la transición epitelial a mesenquimatosa (TEM) de las células de colon en un modelo *in vitro* (Brunton et al., (2001) Neoplasia 3: 215-26; Bates et al., (2005) J. Clin. Invest. 115: 339-47). El TEM es un proceso de desarrollo normal que permite que las células epiteliales salgan de sus tejidos domésticos y puedan emigrar hacia a nuevas áreas (Thiery y Sleeman, (2006) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7: 131-42). Está marcado por un aumento en la expresión de proteínas que promueven la migración e invasión de las células, como las proteasas de la matriz, las citoquinas como el TGF β y una variedad de moléculas de adhesión celular, incluyendo a las integrinas (Zavadil y Bottinger, (2005) Oncogene 24: 5764-5774). La expresión de marcadores TEM también se ha identificado en tumores, particularmente en los agresivamente invasivos y en carcinomas metastásicos. La capacidad de $\alpha V\beta 6$ para promover la adhesión a la fibronectina intersticial, regular positivamente la expresión de MMP-9 y de otras proteasas de matriz y activar TGF β indica que puede facilitar la TEM de las células malignas y la progresión tumoral (Bates and Mercurio, (2005) Cancer Bio. & Ther. 4: 365-70).

Los modelos animales y los modelos *in vitro* de cáncer humano han implicado la transducción de señales mediada por $\alpha V\beta 6$ en la promoción de la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis. Se identificaron los residuos en el extremo C-terminal de la cadena beta 6 que promueven la proliferación de células tumorales de colon SW480 transfectadas con $\alpha V\beta 6$ en una matriz de gel de colágeno *in vitro*. En comparación con las células SW480 transfectadas con $\beta 6$ de longitud completa, la mutante por la delección $\beta 6$ tuvo una capacidad marcadamente reducida para crecer subcutáneamente en ratones Nude (Agrez et al., (1994) J. Cell. Biol. 127: 547-56). En una línea celular de cáncer oral que expresaba de forma estable $\alpha V\beta 6$, la unión a fibronectina dio como resultado el reclutamiento y la activación de la cinasa Fyn por la subunidad beta 6. La transducción de señales río abajo resultó en la producción de MMP-3, promovió la proliferación celular *in vitro*, la invasión tumoral en un modelo ortotópico y la metástasis en un modelo de inyección en la vena de la cola (Li et al., (2003) J. Biol. Chem. 278: 41646-53).

La supresión de la apoptosis, como la proliferación celular, es otra forma en la que $\alpha V\beta 6$ puede promover el crecimiento tumoral. Los epitelios escamosos estratificados normales expresan a la integrina $\alpha V\beta 5$, pero la regulan negativamente mientras que regulan positivamente la expresión de $\alpha V\beta 6$ al transformarse en carcinomas. Utilizando líneas celulares de carcinoma que sobre-expresan a $\alpha V\beta 5$, se demostró que la expresión de $\alpha V\beta 6$ previene la muerte celular inducida por suspensión (anoikis) en condiciones *in vitro* (Janes and Watt, (2004) J. Cell Biol. 166: 419-31). La inhibición de la apoptosis también se ha observado *in vitro* en líneas celulares de cáncer de ovario tratadas con cisplatino, lo que puede representar un mecanismo para la resistencia a fármacos de estos tumores *in vivo* (Wu et al., (2004) Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 39: 112-14).

Varios investigadores han desarrollado agentes terapéuticos para atacar la actividad de $\alpha V\beta 6$ en la fibrosis y en el cáncer. Se demostró que un anticuerpo murino con especificidad para las integrinas $\alpha V\beta 6$, $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$ previene la adhesión de células de carcinoma de colon HT29 a vitronectina y fibronectina *in vitro* (Lehmann et al., (1994) Can. Res. 54: 2102-07). Se demostró que otro anticuerpo terapéutico murino específico para la proteína $\alpha V\beta 6$ humana inhibe el crecimiento invasivo de células de carcinoma orales HSC-3 en un modelo de tumor de xenoinjerto transoral en ratones (Xue et al., (2001) Biochem. Biophys. Res. Com. 288: 610-18). Se generó una serie de anticuerpos específicos contra $\alpha V\beta 6$ de humanos utilizando el modelo de ratones beta 6 nulos como huésped. Estos anticuerpos fueron capaces de bloquear la unión de TGF β LAP y de fibronectina a la integrina *in vitro* (Weinreb et al., (2004) J. Biol.

Chem. 279: 17875-87). También demostraron una inhibición significativa del crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer faríngeo humano (Leone et al., (2003) Proc. Of Am. Assoc. Can. Res. 44, Abstract # 4069). Los documentos WO 03/087340 y WO 03/100033 describen anticuerpos que se unen a $\alpha V\beta 6$ y métodos para generar dichos anticuerpos.

- 5 Adicionalmente a la función de los anticuerpos bloqueadores, se ha reportado la creación de un inhibidor péptido mimético de la integrina $\alpha V\beta 6$ humana. Se demostró que este compuesto inhibe la unión de las células UCLAP-3 a la fibronectina con una IC₅₀ en el intervalo de 200 nM con actividad adicional para bloquear la unión de las células mediadas por la integrina $\alpha V\beta 5$ y $\alpha V\beta 3$ a la vitronectina en el intervalo de 3-20 μM , respectivamente (Goodman and 2002) J. Med. Chem. 45: 1045-51).
- 10 Otro papel recientemente descrito para $\alpha V\beta 6$ es como un receptor celular para patógenos virales. Este media la unión de la cápside viral para el virus de pies y manos y el virus Coxsackievirus 9 para permitir la entrada viral en condiciones *in vitro* (Miller et al, (2001) J. Virol. 75: 4158-64; Williams et al, (2004) J. Virol. 78: 6967-73). Tanto las proteínas de la cápside del virus de pies y manos como las de Coxsackievirus 9 contienen una secuencia de RGD que es reconocida por múltiples miembros de la familia de las integrinas. La entrada viral de ambos patógenos está bloqueada por el 15 anticuerpo contra la integrina $\alpha V\beta 6$ (Williams et al., (2004) J. Virol. 78: 6967-73).

Sumario

Esta divulgación se dirige generalmente a agentes de unión dirigidos que se unen a $\alpha V\beta 6$. En presente divulgación también se describen agentes de unión completamente humanos dirigidos que se unen específicamente a $\alpha V\beta 6$ y, por lo tanto, inhiben la unión de ligandos a $\alpha V\beta 6$. Los agentes de unión dirigidos también inhiben la adhesión de células 20 tumorales. Adicionalmente, los agentes de unión dirigidos son útiles para reducir el crecimiento del tumor. Los mecanismos por los cuales esto puede ser logrado, pueden incluir y no están limitados a inhibir la unión de un ligando a su receptor $\alpha V\beta 6$, la anulación de interacciones con ligandos tales como TGF β -LAP, reduciendo así la concentración efectiva de $\alpha V\beta 6$.

En la presente también se describe que el agente de unión dirigido es un anticuerpo completamente humano que se une a $\alpha V\beta 6$ y evita la unión de $\alpha V\beta 6$ a ligandos de $\alpha V\beta 6$. Los ejemplos de ligandos de $\alpha V\beta 6$ incluyen TGF β LAP, 25 fibronectina, tenascina, vitronectina y osteopontina. El anticuerpo se puede unir a $\alpha V\beta 6$ con una K_d inferior a 35 nM, 25 nM, 10 nM o 60 pM.

En la presente también se describe un anticuerpo completamente humano que se une a $\alpha V\beta 6$ e inhibe más del 80%, 85%, 90% o 99% de la adhesión mediada por TGF β -LAP de células HT29 a concentraciones de anticuerpos tan bajas como 1 $\mu g/ml$ o menos. 30

En la presente también se describe un anticuerpo completamente humano que se une a $\alpha V\beta 6$ e inhibe la adhesión mediada por TGF β -LAP de células HT29 con una IC₅₀ menor a 0.070 $\mu g/ml$.

El agente de unión dirigido (es decir, un anticuerpo) puede comprender una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene una región determinante de complementariedad (RDC) con una de las secuencias mostradas en la 35 Tabla 8 o la Tabla 29. También se describe en la presente donde el agente de unión dirigido puede comprender una secuencia que comprende una cualquiera de una secuencia de RDC1, RDC2 o RDC3 como se muestra en la Tabla 8 o la Tabla 29. También se describe en la presente donde el agente de unión dirigido puede comprender una secuencia que comprende dos de una secuencia de RDC1, RDC2 o RDC3 como se muestra en la Tabla 8 o en la Tabla 29 (es decir, que sea una RDC1 y una RDC2, una RDC1 y una RDC3 o una RDC2 y una RDC3). También se describe en la 40 presente donde el agente de unión dirigido puede comprender una secuencia que comprende una secuencia de RDC1, RDC2 y RDC3 como se muestra en la Tabla 8 o en la Tabla 29. Es importante notar que los expertos en la técnica pueden realizar fácilmente determinaciones de RDC. Véase, por ejemplo, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

También se describe en la presente donde el agente de unión dirigido (es decir, un anticuerpo) puede comprender una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que tiene una región determinante de complementariedad (RDC), 45 secuencias de RDC1, RDC2 o RDC3 como se muestra en la Tabla 9 o en la Tabla 30. También en la presente es donde el agente de unión dirigido puede comprender una secuencia que comprende dos de una secuencia de RDC1, RDC2 o RDC3 como se muestra en la Tabla 9 o en la Tabla 30 (es decir, una que sea RDC1 y RDC2, una RDC1 y RDC3, o una RDC2 y RDC3). También se describe en la presente, donde el agente de unión dirigido puede 50 comprender una secuencia que comprende una secuencia de RDC1, RDC2 y RDC3 como se muestra en la Tabla 9 o la Tabla 30.

El agente de unión dirigido descrito en la presente puede comprender un sitio de unión a un antígeno dentro de una molécula sin anticuerpo, normalmente proporcionada por una o más RDC, por ejemplo, un conjunto de RDC en un andamio de proteínas sin anticuerpos, como se explica más adelante.

55 También se describe en la presente, donde el agente de unión dirigido comprende una secuencia que comprende a cualquiera de las secuencias RDC1, RDC2 o RDC3 de anticuerpos monoclonales completamente humanos sc 264

RAD, sc 264 RAD/ADY, sc 188 SDM, sc 133, sc 133 TMT, sc 133 WDS, sc 133 TMT/WDS, sc 188, sc 254, sc 264 o sc 298.

5 También se describe en la presente, donde el agente de unión dirigido comprende cualquiera de dos de una secuencia RDC1, RDC2 o RDC3 de anticuerpos monoclonales completamente humanos sc 264 RAD, sc 264 RAD/ADY, sc 188 SDM, sc 133, sc 133 TMT, sc 133 WDS, sc 133 TMT/WDS, sc 188, sc 254, sc 264 o sc 298 (es decir, que es RDC1 y RDC2, una RDC1 y RDC3 o una RDC2 y RDC3).

También se describe en la presente donde el agente de unión dirigido comprende una secuencia RDC1, RDC2 y RDC3 de anticuerpos monoclonales completamente humanos sc 264 RAD, sc 264 RAD/ADY, sc 188 SDM, sc 133, sc 133 TMT, sc 133 WDS, sc 133 TMT/WDS, sc 188, sc 254, sc 264 o sc 298.

10 En la presente también se describe, donde el agente de unión dirigido es un anticuerpo. En el presente se describe, donde el agente de unión dirigido es un anticuerpo monoclonal. En la presente se describe donde el agente de unión dirigido es un anticuerpo monoclonal completamente humano.

15 En la presente, también se describe un anticuerpo que se une a $\alpha\beta6$ y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende cualquiera de una secuencia de RDC1, RDC2 o RDC3 como se muestra en la Tabla 9 o en la Tabla 30. También se describe en la presente, un anticuerpo que se une a $\alpha\beta6$ y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende cualquiera de dos de una secuencia de RDC1, RDC2 o RDC3 como se muestra en la Tabla 9 o en la Tabla 30 (que es una RDC1 y RDC2, una RDC1 y RDC3 o una RDC2 y RDC3). En la presente también se describe un anticuerpo que se une a $\alpha\beta6$ y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende una secuencia de RDC1, un RDC2 y RDC3 como se muestra en la Tabla 9 o en la Tabla 20 30. También se describe en la presente, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completamente humano.

25 En la presente también se describe un anticuerpo que se une a $\alpha\beta6$ y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende a cualquiera de las secuencias de RDC1, RDC2 o RDC3 como se muestra en la Tabla 8 o en la Tabla 29. También se describe la presente un anticuerpo que se une a $\alpha\beta6$ y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende cualquiera de dos de una secuencia de RDC1, RDC2 o RDC3 como se muestra en la Tabla 8 o en la Tabla 29 (es decir, una RDC1 y RDC2, una RDC1 y RDC3 o una RDC2 y RDC3). En la presente también se describe un anticuerpo que se une a $\alpha\beta6$ y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende una secuencia de RDC1, una RDC2 y RDC3 como se muestra en la Tabla 8 o en la Tabla 29. También se describe en la presente, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completamente humano.

30 También se describe en la presente uno o más de los anticuerpos monoclonales completamente humanos sc 264 RAD, sc 264 RAD/ADY, sc 188 SDM, sc 133, sc 133 TMT, sc 133 WDS, sc 133 TMT/WDS, sc 188, sc 254, sc 264 o sc 298 que se unen específicamente a $\alpha\beta6$, como se discute con más detalle a continuación.

35 En la presente también se describe un anticuerpo que se une a $\alpha\beta6$ y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que tiene una RDC que comprende una de las secuencias mostradas en la Tabla 9 o en la Tabla 30. También se describe en este documento un anticuerpo que se une a $\alpha\beta6$ y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene una RDC que comprende una de las secuencias mostradas en la Tabla 8 o en la Tabla 29. También se describe en la presente, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completamente humano.

40 En la presente también se describe un anticuerpo que se une a $\alpha\beta6$ y comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene una de las secuencias de RDC mostradas en la Tabla 8 o en la Tabla 29 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que tiene una de las secuencias de RDC mostradas en la Tabla 9 o en la Tabla 30. También se describe en la presente, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completamente humano.

45 También se describe en la presente un agente de unión dirigido (es decir, un anticuerpo) que compite por la unión a $\alpha\beta6$ con los anticuerpos descritos en la presente. También se describe la presente, donde dicho agente de unión dirigido comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene al menos una de las secuencias de RDC mostradas en la Tabla 8 o en la Tabla 29 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que tiene al menos una de las secuencias de RDC mostradas en la Tabla 9 o en la Tabla 30.

50 También se describe en la presente, un agente de unión dirigido que se une al mismo epítoto en $\alpha\beta6$ que los anticuerpos descritos en la presente. En el presente también se describe en donde dicho agente de unión dirigido comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene al menos una de las secuencias de RDC mostradas en la Tabla 8 o en la Tabla 29 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que tiene al menos una de las secuencias de RDC mostradas en la Tabla 9 o en la Tabla 30.

55 También se describe en la presente, donde el agente de unión dirigido comprende una secuencia que comprende una secuencia cualquiera de RDC1, RDC2 o RDC3 como se muestra en la Tabla 8 o la Tabla 29 y cualquiera de una secuencia de RDC1, RDC2 o RDC3 como se muestra en la Tabla 9 o en la Tabla 30. También se describe en presente, donde el agente de unión dirigido comprende dos de una secuencia de RDC1, RDC2 o RDC3, como se muestra en la Tabla 8 o en la Tabla 29 y cualquiera de dos de una secuencia de RDC1, RDC2 o RDC3 como se muestra en la Tabla 9 o en la Tabla 30 (es decir, que es una RDC1 y una RDC2, una RDC1 y una RDC3 o una RDC2 y una RDC3).

También se describe la presente, donde el agente de unión dirigido comprende una secuencia de RDC1, RDC2 y RDC3 como se muestra en la Tabla 8 o en la Tabla 29 y una secuencia de RDC1, RDC2 y RDC3 como se muestra en la Tabla 9 o en la Tabla 30.

5 El presente documento también describe, donde un agente de unión puede comprender un sitio de unión a antígeno dentro de una molécula sin anticuerpo, normalmente proporcionado por una o más RDC, por ejemplo, un conjunto de RDC en un andamio de proteínas sin anticuerpos, como se discute más adelante.

10 En la presente también se describe un anticuerpo que se une a $\alpha V\beta 6$ y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una o más mutaciones correctivas en las que la secuencia de L anticuerpo se muta de nuevo a su secuencia de línea germinal respectiva. Por ejemplo, el anticuerpo puede tener una secuencia como se muestra en cualquiera de las Tablas 10 a la 13.

En la presente también se describen métodos para analizar el nivel de $\alpha V\beta 6$ en un paciente o en una muestra de paciente, que comprenden poner en contacto un anticuerpo anti- $\alpha V\beta 6$ con la muestra biológica de un paciente y detectar el nivel de unión entre dicho anticuerpo y $\alpha V\beta 6$ en la muestra en cuestión. También se describe en la presente, donde la muestra biológica es sangre o plasma.

15 En la presente también se describen composiciones que comprenden un agente de unión dirigido, que incluye un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 En la presente también se describen métodos para tratar de manera eficaz a un animal que padece una enfermedad o trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$, que incluye seleccionar un animal que necesite tratamiento para una enfermedad neoplásica o no neoplásica, y administrar a el animal una dosis terapéuticamente eficaz del anticuerpo monoclonal completamente humano que se une específicamente a $\alpha V\beta 6$.

25 Los anticuerpos descritos en la presente se pueden utilizar para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$. Una enfermedad o trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$ puede ser cualquier afección que surja debido a la activación o expresión aberrantes de $\alpha V\beta 6$. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen cuando $\alpha V\beta 6$ interactúa de forma aberrante con sus ligandos, por lo tanto alterando las propiedades de adhesión celular o señalización celular. Esta alteración en la adhesión celular o en las propiedades de señalización celular pueden resultar en enfermedades neoplásicas. Otras enfermedades o trastornos relacionados con $\alpha V\beta 6$ incluyen trastornos inflamatorios, enfermedades pulmonares, enfermedades asociadas con fibrosis y cualquier enfermedad asociada con un TGF- β desregulado.

30 En un ejemplo, la enfermedad relacionada con $\alpha V\beta 6$ es una enfermedad neoplásica como melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), tumor tiroideo, cáncer gástrico (estómago), cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de páncreas, carcinoma de esófago, cánceres de cabeza y cuello, mesotelioma, sarcomas, biliar (colangiocarcinoma), adenocarcinoma de intestino delgado, eoplasias malignas pediátricas y carcinoma epidermoide.

35 En otro ejemplo, la enfermedad relacionada con $\alpha V\beta 6$ es un trastorno inflamatorio, como la enfermedad inflamatoria del intestino; lupus eritematoso sistémico; artritis reumatoide; artritis crónica juvenil; espondiloartropatías; esclerosis sistémica, por ejemplo, esclerodermia; miopatías idiopáticas inflamatorias, por ejemplo, dermatomiositis, polimiositis; Síndrome de Sjogren; vaculitis sistémica; sarcoidosis; tiroiditis, por ejemplo, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica; enfermedad renal mediada por el sistema inmunitario, por ejemplo, glomerulonefritis, nefritis tubulointerestitial; enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central y del periférico, como esclerosis múltiple, polineuropatía idiopática; enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosas tales como hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos; hepatitis activa crónica autoinmune; cirrosis biliar primaria; hepatitis granulomatosa; y colangitis esclerosante; enfermedades pulmonares inflamatorias y fibróticas (por ejemplo, fibrosis quística); enteropatía sensible al gluten; enfermedades de la piel autoinmunes o inmunitarias, como enfermedades de la piel ampollas, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis; 45 enfermedades alérgicas de los pulmones, como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática, conjuntivitis alérgica y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas al trasplante, como rechazo de injertos y enfermedad de injerto contra huésped.

En otro ejemplo más, la enfermedad relacionada con $\alpha V\beta 6$ es fibrosis, tal y como fibrosis de riñón o pulmón.

50 En otro ejemplo más, la enfermedad relacionada con $\alpha V\beta 6$ está asociada con un TGF- β desregulado que incluye cáncer y trastornos del tejido conectivo (fibrótico).

En la presente también se describen métodos para inhibir la adhesión celular inducida por $\alpha V\beta 6$ en un animal. Estos métodos incluyen seleccionar a un animal que necesite tratamiento para la adhesión celular inducida por $\alpha V\beta 6$ y administrar a dicho animal una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal completamente humano en el que dicho anticuerpo se une de manera específica a $\alpha V\beta 6$.

En la presente, también se describe el uso de un anticuerpo en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o de un trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$ en un animal, en el que dicho anticuerpo monoclonal se une de manera específica a $\alpha V\beta 6$.

5 También se describe la presente, donde los agentes de unión dirigidos descritos en la presente pueden utilizarse para la preparación de un medicamento para el tratamiento eficaz de la adhesión celular inducida por $\alpha V\beta 6$ en un animal, en el que dicho anticuerpo monoclonal se une de manera específica a $\alpha V\beta 6$.

10 En la presente también se describen anticuerpos monoclonales que se unen a $\alpha V\beta 6$ y afectan a la función $\alpha V\beta 6$. En la presente también se describen los anticuerpos anti- $\alpha V\beta 6$ completamente humanos y las preparaciones de anticuerpos anti- $\alpha V\beta 6$ con propiedades deseables desde una perspectiva terapéutica, que incluyen una alta afinidad de unión por $\alpha V\beta 6$, la capacidad de neutralizar $\alpha V\beta 6$ *in vitro* e *in vivo* y la capacidad de inhibir las células inducidas a la adhesión celular y al crecimiento tumoral por $\alpha V\beta 6$.

15 En la presente también se describen anticuerpos que se unen a $\alpha V\beta 6$ con afinidades muy altas (KD). Por ejemplo, un anticuerpo humano, de conejo, de ratón, quimérico o humanizado que es capaz de unirse a $\alpha V\beta 6$ con un Kd menor que, pero no limitado a, aproximadamente 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} o aproximadamente 10^{-11} M, o cualquier intervalo o valor en ellos. Las mediciones de afinidad y/o avides pueden medirse con KinExA® y/o con BIACORE®, como se describe la presente.

20 En la presente también se describen anticuerpos aislados, o fragmentos de estos anticuerpos, que se unen a $\alpha V\beta 6$. Como se conoce en la técnica, los anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales, oligoclonales, monoclonales, quiméricos, humanizados y/o completamente humanos. En la presente también se describen células para poder producir a estos anticuerpos.

25 Se apreciará que esta divulgación no está limitada a ninguna forma en particular de un anticuerpo o método de generación o de producción. Por ejemplo, el anticuerpo anti- $\alpha V\beta 6$ puede ser un anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, con una región Fc humana intacta) o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un Fab, Fab' o F(ab')₂, FV o Dab (Dabs son las unidades de unión funcional más pequeñas de los anticuerpos humanos). Adicionalmente, el anticuerpo puede fabricarse a partir de un hibridoma que secreta el anticuerpo, o de una célula producida de forma recombinante que se ha transformado o se ha transfectado con un gen o genes que codifican para el anticuerpo.

30 También se describen en la presente, moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican para cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente, vectores que tienen moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican para anticuerpos anti- $\alpha V\beta 6$ o una célula huésped transformada con cualquiera de dichas moléculas de ácidos nucleicos. En la presente también se describe un método para producir un anticuerpo anti- $\alpha V\beta 6$ cultivando células huésped en condiciones en las que se expresa una molécula de ácido nucleico para producir a el anticuerpo seguido de la recuperación del anticuerpo. Debe tenerse en cuenta que esta descripción también incluye cualquier molécula de ácido nucleico que codifica para un anticuerpo o un fragmento de un anticuerpo descrito en el presente documento que incluye secuencias de ácidos nucleicos optimizadas para aumentar los rendimientos de anticuerpos o fragmentos de los mismos cuando se transfectan en células huésped para la producción de anticuerpos.

35 En la presente también se describe un método para la producción de anticuerpos de alta afinidad a $\alpha V\beta 6$ mediante la inmunización de un mamífero con $\alpha V\beta 6$ humano, o un fragmento del mismo, y una o más secuencias ortólogas o fragmentos de los mismos.

40 En la presente también se describe la generación e identificación de anticuerpos aislados que se unen de manera específica a $\alpha V\beta 6$. La inhibición de la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$ puede prevenir la adhesión celular inducida por $\alpha V\beta 6$ y otros efectos deseados.

45 También se describe en la presente, un método para diagnosticar enfermedades o trastornos en los que se utiliza un anticuerpo preparado como se describe en la presente para detectar el nivel de $\alpha V\beta 6$ en la muestra de un paciente. También se describe en la presente, donde la muestra del paciente es sangre o suero sanguíneo. En la presente también se describen métodos para la identificación de factores de riesgo, el diagnóstico de la enfermedad y la estadificación de la enfermedad, lo que involucra la identificación de la sobreexpresión de $\alpha V\beta 6$ utilizando anticuerpos anti- $\alpha V\beta 6$.

50 En la presente también se describe un método para diagnosticar una afección asociada con la expresión de $\alpha V\beta 6$ en una célula poniendo en contacto el suero o una célula con un anticuerpo anti- $\alpha V\beta 6$, y posteriormente detectando la presencia de $\alpha V\beta 6$. Las afecciones preferidas incluyen una enfermedad o un trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$ que incluye, pero no se limita a, enfermedades neoplásicas, como melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), glioblastoma y carcinoma de tiroides, estómago, próstata, mama, ovario, vejiga, pulmón, útero, riñón, colon y páncreas, glándulas salivales y colorectal.

55 En la presente también se describe un kit de ensayo para detectar a $\alpha V\beta 6$ en tejidos, células o fluidos corporales de mamíferos para detectar a las enfermedades relacionadas con $\alpha V\beta 6$. El kit incluye un anticuerpo que se une a $\alpha V\beta 6$ y un medio para indicar la reacción del anticuerpo con $\alpha V\beta 6$, si es que está presente. También se describe en la

presente, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. También se describe en la presente, donde el anticuerpo que se une a $\alpha V\beta 6$ está marcado. También se describe en la presente, donde el anticuerpo es un anticuerpo primario que no está marcado y el kit incluye además un medio para poder detectar a el anticuerpo primario. También se describe en la presente, donde los medios para detectar incluyen un segundo anticuerpo marcado que es una anti-inmunoglobulina. El anticuerpo puede estar marcado con un marcador seleccionado del grupo que consiste en un fluorocromo, una enzima, un radionúclido y un material radiopaco.

En la presente también se describen composiciones farmacéuticas que tienen una cantidad efectiva de un anticuerpo anti- $\alpha V\beta 6$ en mezcla con un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptable. También se describe en la presente, donde el anticuerpo anti- $\alpha V\beta 6$, o un fragmento del mismo, se conjuga con un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, una toxina o un radioisótopo.

En la presente también se describen métodos para tratar enfermedades o trastornos asociados con la expresión de $\alpha V\beta 6$ en un paciente, administrando a el paciente una cantidad efectiva de un anticuerpo anti- $\alpha V\beta 6$. El anticuerpo anti- $\alpha V\beta 6$ se puede administrar solo o se puede administrar en combinación con anticuerpos adicionales o con quimioterapia o con radioterapia. Por ejemplo, se puede administrar una mezcla monoclonal, oligoclonal o policlonal de anticuerpos $\alpha V\beta 6$ que se capaz de bloquear la adhesión celular en combinación con un medicamento que inhibe directamente la proliferación de las células tumorales. El método puede realizarse *in vivo* y el paciente es preferiblemente un paciente humano. En la presente también se describe un método donde se refiere al tratamiento de una enfermedad o de un trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$ que incluye, pero no se limita a, enfermedades neoplásicas, como melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), glioblastoma y carcinoma de tiroides, estómago, próstata, mama, ovario, vejiga, pulmón, útero, riñón, colon y páncreas, glándulas salivales y colorectal.

También se describe en la presente un artículo de fabricación que incluye un recipiente. El recipiente incluye una composición que contiene un anticuerpo anti- $\alpha V\beta 6$, y un prospecto o etiqueta que indica que la composición se puede usar para tratar una enfermedad o un trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$, caracterizado por la sobreexpresión de $\alpha V\beta 6$.

También se describe en la presente, donde el anticuerpo anti- $\alpha V\beta 6$ se administra a un paciente, seguido de la administración de un agente de limpieza para eliminar el exceso del anticuerpo circulante en la sangre.

También se describe en la presente el uso de un anticuerpo anti- $\alpha V\beta 6$ en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con $\alpha V\beta 6$, tales como enfermedades neoplásicas, trastornos inflamatorios, fibrosis, enfermedades pulmonares o enfermedades asociadas con TGF- β desregulado. También se describe en la presente, donde las enfermedades neoplásicas incluyen carcinoma, tal como cáncer de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salival, pulmón, riñón, colon, colorrectal, esófago, tiroides, páncreas, próstata y vejiga. En la presente también se describe donde las enfermedades o trastornos relacionados con $\alpha V\beta 6$ incluyen, pero no se limitan a, enfermedades neoplásicas, como melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), sarcoma, cánceres de cabeza y cuello, mesotelioma, biliares (colangiocarcinoma), adenocarcinoma de intestino delgado, tumores malignos pediátricos y glioblastoma.

En la presente también se describe el uso de un anticuerpo anti- $\alpha V\beta 6$ en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades inflamatorias o hiperproliferativas que incluyen, pero no se limitan a, artritis, aterosclerosis, conjuntivitis alérgica.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una gráfica lineal que muestra la capacidad de los anticuerpos monoclonales purificados para unirse a $\alpha V\beta 6$ y bloquear su unión a un péptido GST-LAP.

Las Figuras 2A y 2B son gráficas lineales que muestran una gráfica de la Fluorescencia Media Geométrica (FMG) promedio en función de la concentración de mAb molecular, que se utilizó para estimar la afinidad de unión de uno de los anticuerpos a células K562 que expresan de manera estable a el antígeno $\alpha V\beta 6$ humano. En la figura 2A se muestran los datos de afinidad para el mAb 188. La figura 2B muestra los datos de afinidad para el mAb 264 RAD.

Las Figuras 3A-3E son gráficos de barras que muestran la capacidad de los anticuerpos monoclonales purificados para mediar la citotoxicidad dependiente del complemento en células 293 que expresan de manera estable la integrina $\alpha V\beta 6$.

La Figura 4 es una gráfica de barras que muestra la capacidad de los anticuerpos 264RAD, 133 y 188 SDM para inhibir el crecimiento tumoral utilizando la línea de células nasofaríngeas Detroit-562.

La Figura 5 es un gráfica de barras que muestra la comparación de la actividad de 264 RAD con 264 RAD/ADY.

Descripción detallada

En la presente se describen agentes de unión dirigidos que se unen a la integrina $\alpha V\beta 6$ ($\alpha V\beta 6$). En la presente se describen agentes de unión que se unen a $\alpha V\beta 6$ e inhiben la unión de ligandos a $\alpha V\beta 6$. También se describe en la

presente donde los agentes de unión dirigidos son anticuerpos monoclonales, o fragmentos de unión de los mismos. También se describe en la presente donde los anticuerpos que se unen solo a la cadena $\beta 6$ son capaces de inhibir la unión de los ligandos a $\alpha V\beta 6$.

5 En la presente también se describen anticuerpos anti- $\alpha V\beta 6$ completamente humanos, y preparaciones de anticuerpos que son terapéuticamente útiles. En la presente también se describe donde las preparaciones de anticuerpos anti- $\alpha V\beta 6$ tienen propiedades terapéuticas deseables, que incluyen una fuerte afinidad de unión por $\alpha V\beta 6$, y la capacidad de inhibir la adhesión celular mediada por TGF β LAP *in vitro*.

10 En la presente también se describen fragmentos de unión aislados completamente de humanos de anticuerpos anti- $\alpha V\beta 6$. También se describe en la presente donde los fragmentos de unión se derivan de anticuerpos anti- $\alpha V\beta 6$ completamente humanos. Los fragmentos para ejemplificar incluyen Fv, Fab' u otros fragmentos de anticuerpos bien conocidos, como se describe con más detalle a continuación. En la presente también se describen células que expresan anticuerpos completamente humanos contra $\alpha V\beta 6$. Los ejemplos de células incluyen hibridomas o células creadas de forma recombinante, como células de ovario de hámster chino (CHO), variantes de células CHO (por ejemplo, DG44) y células NS0 que producen anticuerpos contra $\alpha V\beta 6$. Se puede encontrar información adicional sobre las variantes de células CHO en Andersen and Reilly (2004) Current Opinion in Biotechnology 15, 456-462.

15 En la presente también se describen métodos para utilizar estos anticuerpos para el tratamiento de una enfermedad o un trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$. Una enfermedad o un trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$ puede ser cualquier afección que surja debido a la activación o a la expresión aberrante de $\alpha V\beta 6$. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen cuando $\alpha V\beta 6$ interactúa de forma aberrante con sus ligandos, por lo tanto alterando las propiedades de adhesión celular o de señalización celular. Esta alteración en la adhesión celular o las propiedades de señalización celular pueden resultar en enfermedades neoplásicas. Otras enfermedades o trastornos relacionados con $\alpha V\beta 6$ incluyen trastornos inflamatorios, enfermedades pulmonares, enfermedades asociadas con fibrosis y cualquier enfermedad asociada con TGF- β desregulado.

20 En un ejemplo, la enfermedad relacionada con $\alpha V\beta 6$ es una enfermedad neoplásica como el melanoma, el cáncer de pulmón de células pequeñas, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), tumor tiroideo, cáncer gástrico (estómago), cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de páncreas, carcinoma de esófago, cáncer de cabeza y cuello, mesotelioma, sarcomas, biliar (colangiocarcinoma), adenocarcinoma de intestino delgado, neoplasias pediátricas y carcinoma epidermoide.

25 En otro ejemplo, la enfermedad relacionada con $\alpha V\beta 6$ es un trastorno inflamatorio tal como enfermedad inflamatoria del intestino; lupus eritematoso sistémico; artritis reumatoide; artritis crónica juvenil; espondiloartropatías; esclerosis sistémica, por ejemplo, esclerodermia; miopatías idiopáticas inflamatorias, por ejemplo, dermatomiositis, polimiositis; síndrome de Sjogren; vaculitis sistémica; sarcoidosis; tiroiditis, por ejemplo, enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica; enfermedad renal mediada por el sistema inmune, por ejemplo, glomerulonefritis, nefritis tubulointerstitial; enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, como esclerosis múltiple, polineuropatía idiopática; enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosas tales como hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos; hepatitis crónica activa autoinmune; cirrosis biliar primaria; hepatitis granulomatosa; y colangitis esclerosante; enfermedades pulmonares inflamatorias y fibróticas (por ejemplo, fibrosis quística); enteropatía sensible al gluten; enfermedades de la piel autoinmunes o inmunitarias, como enfermedades de la piel, ampollas, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis; enfermedades alérgicas de los pulmones, como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática, conjuntivitis alérgica y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas al trasplante, como rechazo de injertos y enfermedad de injerto contra huésped.

En aún otro ejemplo más, la enfermedad relacionada con $\alpha V\beta 6$ es la fibrosis, como la fibrosis renal o la pulmonar.

45 En aún otro ejemplo, la enfermedad relacionada con $\alpha V\beta 6$ está asociada con TGF-P desregulado incluyendo cáncer y trastornos del tejido conectivo (fibróticos).

50 En la presente también se describen ensayos de diagnóstico para determinar específicamente la cantidad de $\alpha V\beta 6$ que hay en una muestra biológica. El kit de ensayo puede incluir anticuerpos anti- $\alpha V\beta 6$ junto con los marcadores necesarios para detectar a dichos anticuerpos. Estos ensayos de diagnóstico son útiles para detectar enfermedades relacionadas con αV o trastornos $\beta 6$ que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades neoplásicas, tales como melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), glioblastoma y carcinoma de tiroides, estómago, próstata, mama, ovario, vejiga, pulmón, útero, riñón, colon y páncreas, glándulas salivales y colorrectal.

55 En la presente también se describe un antagonista de la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$ en la que el antagonista se une a $\alpha V\beta 6$. También se describe en la presente donde el antagonista es un agente de unión dirigido, como un anticuerpo.

El antagonista se puede unir a:

i) a $\beta 6$ solo;

ii) a $\alpha V\beta 6$; o

iii) a el complejo $\alpha V\beta 6$ /ligando,

o a una combinación de estos. También se describe en la presente donde el anticuerpo es capaz de antagonizar la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$ *in vitro* e *in vivo*. El anticuerpo puede seleccionarse de un anticuerpo monoclonal completamente humano, por ejemplo, sc 264 RAD, sc 264 RAD/ADY, sc 188 SDM, sc 133, sc 133 TMT, sc 133 WDS, sc 133 TMT/WDS, sc 188, sc 254, sc 264 o sc 298 o las variantes de los mismos.

También se describe en la presente donde el antagonista de la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$ puede unirse a $\alpha V\beta 6$ y, por lo tanto, prevenir la adhesión celular mediada por TGF β LAP.

En la presente también se describe un anticuerpo que se une al mismo epítotope o epítotope que el anticuerpo monoclonal completamente humano c 264 RAD, sc 264 RAD/ADY, sc 188 SDM, sc 133, sc 133 TMT, sc 133 WDS, sc 133 TMT/WDS, sc 188, sc 254, sc 264 o sc 298.

También se describe en la presente donde el agente de unión dirigido se une a $\alpha V\beta 6$ con una K_d de menos de 100 nanomolar (nM). El agente de unión dirigido puede unirse con una K_d inferior a aproximadamente 35 nanomolar (nM). El agente de unión dirigido puede unirse con una K_d inferior a aproximadamente 25 nanomolar (nM). El agente de unión dirigido puede unirse con una K_d inferior a aproximadamente 10 nanomolar (nM). También se describe en la presente donde el agente de unión dirigido se une con una K_d de menos de aproximadamente 60 picomolar (pM).

También se describe en la presente una célula plasmática secretora de anticuerpos que produce la cadena ligera y/o la cadena pesada del anticuerpo como se describe anteriormente. También se describe en la presente donde la célula plasmática produce la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal completamente humano. También se describe en la presente donde la célula plasmática produce la cadena ligera y/o la cadena pesada del anticuerpo monoclonal completamente humano c 264 RAD, sc 264 RAD/ADY, sc 188 SDM, sc 133, sc 133 TMT, sc 133 WDS, sc 133 TMT/WDS, sc 188, sc 254, sc 264 o sc 298. Alternativamente, la célula plasmática puede producir un anticuerpo que se une al mismo epítotope o epítotope que el anticuerpo monoclonal completamente humano sc c 264 RAD, sc 264 RAD/ADY, sc 188 SDM, sc 133, sc 133 TMT, sc 133 WDS, sc 133 TMT/WDS, sc 188, sc 254, sc 264 o sc 298.

También se describe en la presente una molécula de ácidos nucleicos que codifica para la cadena ligera o para la cadena pesada de un anticuerpo como se describió anteriormente. También se describe en la presente donde la molécula de ácidos nucleicos codifica para la cadena ligera o para la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal completamente humano. En el presente documento también se describe una molécula de ácidos nucleicos que codifica para la cadena ligera o para la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal completamente humano seleccionado de los anticuerpos c 264 RAD, sc 264 RAD/ADY, sc 188 SDM, sc 133, sc 133 TMT, sc 133 WDS, sc 133 TMT/WDS, sc 188, sc 254, sc 264 o sc 298.

También se describe en la presente a un vector que comprende una molécula o moléculas de ácidos nucleicos como se describió anteriormente, en donde el vector codifica para la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo como se definió anteriormente.

También se describe en la presente una célula huésped que comprende un vector como se describe anteriormente. Alternativamente, la célula huésped puede comprender a más de un vector.

En la presente también se describe un método para la producción de un anticuerpo mediante el cultivo de células huésped en condiciones en las que se expresa una molécula de ácido nucleico para producir el anticuerpo, seguido de la recuperación del anticuerpo.

En la presente también se describe un método para fabricar un anticuerpo transfectando al menos a una célula huésped con al menos una molécula de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo, como se describió anteriormente, que expresa a la molécula de ácido nucleico en la célula huésped y se aísla el anticuerpo.

En la presente también se describe un método para antagonizar la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$ que comprende administrar un antagonista como se describe en la presente. El método puede incluir seleccionar un animal que necesite tratamiento para una enfermedad o un trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$, y administrar a el animal una dosis terapéuticamente efectiva de un antagonista de la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$.

En la presente también se describe un método para antagonizar la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$ que comprende administrar un anticuerpo como se describió anteriormente. El método puede incluir seleccionar a un animal que necesite tratamiento para una enfermedad o trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$, y administrar a dicho animal una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que antagonice la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$.

En la presente también se describe un método para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$ en un mamífero, este comprende en administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$. El método puede incluir seleccionar a un animal que necesite tratamiento para una enfermedad o

un trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$, y administrar a dicho animal una dosis terapéuticamente efectiva de un antagonista de la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$.

5 En la presente también se describe un método para tratar una enfermedad o un trastorno de $\alpha V\beta 6$ en un mamífero, este comprende en administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que antagoniza la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$. El método puede incluir seleccionar a un animal que necesite tratamiento para una enfermedad o un trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$, y administrar a dicho animal una dosis terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que antagonice la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$. El anticuerpo puede administrarse solo o puede administrarse en combinación con anticuerpos adicionales o con quimioterapia o con radioterapia.

10 En la presente también se describe un método para tratar el cáncer en un mamífero, este comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$. El método puede incluir seleccionar a un animal que necesite tratamiento para el cáncer, y administrar a dicho animal una dosis terapéuticamente efectiva de un antagonista que antagonice la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$. El antagonista puede administrarse solo o puede administrarse en combinación con anticuerpos adicionales o con quimioterapia o con radioterapia.

15 En la presente también se describe un método para tratar el cáncer en un mamífero, este comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que antagoniza la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$. El método puede incluir seleccionar a un animal que necesite tratamiento para el cáncer y administrar a dicho animal una dosis terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que antagonice la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$. El anticuerpo puede administrarse solo o puede administrarse en combinación con anticuerpos adicionales o con quimioterapia o con radioterapia.

20 En la presente también se describe el uso de un antagonista de la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$ para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$.

En la presente también se describe el uso de un anticuerpo que antagonice la actividad biológica de $\alpha V\beta 6$ para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o de un trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$.

25 En la presente también se describe en la antagonización de $\alpha V\beta 6$, en pacientes con un tumor que depende por si solo, o en parte, de una integrina $\alpha V\beta 6$.

30 En la presente también se describe un kit de ensayo para detectar $\alpha V\beta 6$ en tejidos, células o fluidos corporales de mamíferos para detectar una enfermedad o un trastorno relacionado con $\alpha V\beta 6$. El kit incluye un anticuerpo que se une a $\alpha V\beta 6$ y un medio para indicar la reacción del anticuerpo con $\alpha V\beta 6$, si está presente. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. También se describe en la presente donde el anticuerpo que se une a $\alpha V\beta 6$ está marcado. También se describe en la presente donde el anticuerpo es un anticuerpo primario no marcado y el kit incluye además un medio para detectar a el anticuerpo primario. También se describe en la presente donde los medios incluyen un segundo anticuerpo marcado que es una anti-inmunoglobulina. Preferiblemente, el anticuerpo está marcado con un marcador seleccionado del grupo que consiste en un fluorocromo, una enzima, un radionúclido y un material radiopaco.

35 Más adelante se proporcionan descripciones adicionales con respecto a los anticuerpos anti- $\alpha V\beta 6$.

Listado de secuencias

40 También se describen en la presente los anticuerpos anti- $\alpha V\beta 6$ específicos que se enumeran a continuación en la Tabla 1. Esta tabla informa el número de identificación de cada anticuerpo anti- $\alpha V\beta 6$, junto con el número de SEQ ID del dominio variable de los correspondientes genes de cadena pesada y cadena ligera. A cada anticuerpo se le ha asignado un número de identificación que incluye las letras "sc" seguidas de un número.

Tabla 1

mAb ID No.:	Secuencia	SEQ ID NO:
sc 49	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	1
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	2
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	3
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	4
sc 58	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	5
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	6
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	7

ES 2 746 925 T3

mAb ID No.:	Secuencia	SEQ ID NO:
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	8
sc 97	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	9
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	10
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	11
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	12
sc 133	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	13
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	14
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	15
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	16
sc 161	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	17
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	18
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	19
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	20
sc 188	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	21
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	22
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	23
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	24
sc 254	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	25
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	26
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	27
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	28
sc 264	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	29
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	30
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	31
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	32
sc 277 sc 277	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	33
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	34
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	35
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	36
sc 298	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	37
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	38
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	39
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	40
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	41

ES 2 746 925 T3

mAb ID No.:	Secuencia	SEQ ID NO:
sc 320	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	42
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	43
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	44
sc 374	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	45
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	46
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	47
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	48
sc 188 SDM	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	70
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	71
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	72
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	73
sc 264 RAD	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	74
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	75
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	76
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	77
sc 133 TMT	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	78
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	79
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	80
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	81
sc 133 WDS	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	82
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	83
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	84
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	85
sc 133 TMT/WDS	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	86
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	87
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	88
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	89
sc 264 ADY	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	90
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	91
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	92
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	93
sc 264 RAD/ADY	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena pesada	94
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena pesada	95
	Secuencia nucleotídica codificando a la región variable de la cadena ligera	96

mAb ID No.:	Secuencia	SEQ ID NO:
	Secuencia de aminoácidos codificando a la región variable de la cadena ligera	97

Definiciones

- A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos utilizados en la presente tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en las técnicas. Adicionalmente, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos en singular van a incluir pluralidades y los términos en plural incluirán a el singular. En general, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y las técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, y la química de proteínas y oligo o polinucleótidos e hibridación descritas en la presente son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica.
- Se utilizan técnicas estándar para el ADN recombinante, la síntesis de oligonucleótidos y el cultivo y la transformación de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones de los fabricantes o como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en la presente. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y se discuten a lo largo de la presente. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio, de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en la presente son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas estándar se utilizan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.
- Según se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique lo contrario, tienen los siguientes significados:
- El término "y/o" tal y como se utiliza en la presente debe tomarse como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe tomarse como una divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se expusiera individualmente en la presente.
- Un antagonista puede ser un polipéptido, un ácido nucleico, un carbohidrato, un lípido, un compuesto de bajo peso molecular, un oligonucleótido, un oligopéptido, ARN de interferencia (RNAi), antisentido, una proteína recombinante, un anticuerpo o conjugados o proteínas de fusión de los mismos. Para una revisión de RNAi, véase Milhavet O, Gary DS, Mattson MP. (*Pharmacol Rev.* 2003 Dec; 55 (4): 629-48. Review.) y antisentido, véase Opalinska JB, Gewirtz AM. (*Sci STKE.* 2003 Oct 28; 2003 (206): pe47.)
- La activación o expresión aberrante relacionada con la enfermedad de "αVβ6" puede ser cualquier adhesión celular anormal, no deseable o patológica, por ejemplo, adhesión celular relacionada con tumoración. Las enfermedades relacionadas con la adhesión celular incluyen, pero no se limitan a, tumores no sólidos, como leucemia, mieloma múltiple o linfoma, y también tumores sólidos, como melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), glioblastoma, carcinoma de tiroides, conducto biliar, hueso, gástrico, cerebro/SNC, cabeza y cuello, sistema hepático, estómago, próstata, mama, renal, testicular, ovario, piel, cuello uterino, pulmón, músculo, neurona, esófago, vejiga, pulmón, útero, vulva, endometrio, riñón, colorectal, páncreas, membranas pleurales/peritoneales, glándula salival y epidérmica.
- Un componente se refiere a cualquier componente de bajo peso molecular con un peso molecular de menos de aproximadamente 2000 Daltons.
- El término "αVβ6" se refiere a la molécula de integrina heterodimérica que consiste en una cadena αV y una cadena β6.
- El término "neutralizar" cuando se refiere a un agente de unión dirigido, como un anticuerpo, se relaciona con la capacidad de dicho agente de unión dirigido para eliminar, o reducir significativamente, la actividad de un antígeno diana. Por consiguiente, un anticuerpo anti-αVβ6 "neutralizante" es capaz de eliminar o de reducir significativamente la actividad de αVβ6. Un anticuerpo αVβ6 neutralizante puede, por ejemplo, actuar bloqueando la unión de TGFβLAP a la integrina αVβ6. Al bloquear esta unión, la adhesión celular mediada por αVβ6 se elimina de manera significativa o completamente. Idealmente, un anticuerpo neutralizante contra αVβ6 inhibe la adhesión celular.
- El término "polinucleótido aislado" como se utiliza en la presente significará un polinucleótido que ha sido aislado de su entorno natural. Dichos polinucleótidos pueden ser genómicos, ADNc o sintéticos. Los polinucleótidos aislados preferiblemente no están asociados con todos o una porción de los polinucleótidos con los que se asocian en la naturaleza. Los polinucleótidos aislados pueden unirse operativamente a otro polinucleótido al que no está vinculado

en la naturaleza. Además, los polinucleótidos aislados preferiblemente no aparecen en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

El término "proteína aislada" referido en la presente significa una proteína que ha sido aislada del entorno natural en el que se encuentra. Dichas proteínas pueden derivarse de ADN genómico, ADNc, ADN recombinante, ARN recombinante o de origen sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen o fuente de derivación, la "proteína aislada" (1) no está asociada con proteínas encontradas en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de proteínas murinas, (3) está expresada por una célula de una especie diferente, o (4) no ocurre en la naturaleza.

El término "polipéptido" se utiliza en la presente como un término genérico para referirse a una proteína nativa, fragmentos o análogos de una secuencia de polipéptido. Por lo tanto, las proteínas nativas, los fragmentos y los análogos son especies del género polipeptídico. Los polipéptidos preferidos de acuerdo con la divulgación comprenden a las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada humana y las moléculas de inmunoglobulina kappa de cadena ligera humana, así como las moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera, tales como las cadenas ligeras kappa o lambda, y viceversa, así como fragmentos y análogos de los mismos. Los polipéptidos preferidos de acuerdo con la divulgación también pueden comprender únicamente a las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada humana o fragmentos de las mismas.

El término "que ocurre naturalmente" como se utiliza en la presente cuando se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo (incluidos los virus) que puede ser aislada de una fuente en la naturaleza y que el hombre no ha modificado intencionalmente en el laboratorio o que de otra manera ocurre de forma natural.

El término "unido operativamente" como se utiliza en la presente se refiere a las posiciones de los componentes descritos de esta manera que están en una relación que les permite funcionar de la manera ya prevista. Por ejemplo, una secuencia de control "operativamente vinculada" a una secuencia de codificación se conecta de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se logra en condiciones compatibles con las secuencias de control.

El término "polinucleótido" como se refiere en la presente significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido o hetero-dúplex de ARN-ADN. El término incluye formas de ADN de cadena sencilla y doble.

El término "oligonucleótido" al que se hace referencia en la presente incluye nucleótidos que ocurren naturalmente y modificados unidos entre sí por enlaces que ocurren naturalmente y enlaces que no ocurren así. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que generalmente comprenden una longitud de 200 bases o menos. Preferiblemente, los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases y lo más preferible de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son generalmente de cadena sencilla, por ejemplo, para sondas; aunque los oligonucleótidos pueden ser de doble cadena, por ejemplo, para su uso en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos con sentido o antisentido.

El término "nucleótidos que ocurren naturalmente" al que se hace referencia en la presente incluyen desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" al que se hace referencia en la presente incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces de oligonucleótidos" al que se hace referencia en la presente incluye enlaces de oligonucleótidos tales como fosforotioato, fosforditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforaniladato, fosforoamidato y similares. Véase, por ejemplo, LaPlanche et al., Nucl. Acidos Res. 14: 9081 (1986); Stec et al, J. Am. Chem. Soc. 106: 6077 (1984); Stein et al., Nucl. Acidos Res. 16: 3209 (1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al., Patente de EE.UU No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir una etiqueta para la detección, si así se desea.

El término "hibridar selectivamente" al que se hace referencia en la presente significa unirse de forma detectable y específica. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos se hibridan selectivamente a las cadenas de ácidos nucleicos en condiciones de hibridación y de lavado que minimizan las cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Se pueden utilizar condiciones de alta astringencia para lograr condiciones de hibridación selectivas como se conocen en la técnica y como se discuten en la presente. En general, la homología de la secuencia de ácidos nucleicos entre los polinucleótidos, los oligonucleótidos o fragmentos de anticuerpos y una secuencia de interés del ácido nucleico será de al menos el 80%, y más típicamente con homologías crecientes preferenciales de al menos el 85%, 90%, 95%, 99%, y 100%.

El término "región RDC" o "RDC" pretende indicar a las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina como se define según Kabat et al., 1991 (Kabat, EA et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, US Department of Health and Human Services, NIH, Washington) y ediciones posteriores. Un anticuerpo típicamente contiene 3 RDC de cadena pesada y 3 RDC de cadena ligera. El término RDC o RDCs se utiliza en la presente para indicar, según el caso, a una de estas regiones o varias, o incluso la totalidad,

de estas regiones que contienen a la mayoría de los residuos de aminoácidos responsables por la unión de afinidad al anticuerpo para el antígeno o epítipo que este reconoce.

Entre las seis secuencias cortas de RDC, la tercera RDC de la cadena pesada (HRDC3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad se debe esencialmente a los mecanismos de disposición de los genes que la originan).
 5 Puede ser tan corto como 2 aminoácidos, aunque el tamaño más largo conocido es 26. La longitud de la RDC también puede variar de acuerdo con la longitud que puede acomodar el marco subyacente en particular. Funcionalmente, HRDC3 desempeña un papel en parte en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal et al., PNAS, 71: 4298-4302, 1974, Amit et al., Science, 233: 747-753, 1986, Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901-917, 1987, Chothia et al., Nature, 342: 877-883, 1989, Caton et al., J. Immunol., 144: 1965-1968, 1990, Sharon et al., PNAS, 87: 4814-4817, 1990, Sharon et al., J. Immunol., 144: 4863-4869, 1990, Kabat et al., J. Immunol., 147: 1709- 1719, 1991).

El término un "conjunto de RDCs" referido en la presente comprende RDC1, RDC2 y RDC3. Por lo tanto, un conjunto de HRDC se refiere a HRDC1, HRDC2 y HRDC3 (HRDC se refiere a un RDC variable de cadena pesada), y un conjunto de LRDCs se refiere a LRDC1, LRDC2 y LRDC3 (LRDC se refiere a un RDC variable de cadena ligera). A menos que se indique lo contrario, un "conjunto de RDCs" incluye a HRDC y a LRDC.

15 Dos secuencias de aminoácidos son "homólogas" si hay una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, una homología del 85% significa que el 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias están alineadas para una coincidencia máxima. Se permiten espacios (en cualquiera de las dos secuencias que se estén emparejando) para maximizar el emparejamiento; se prefieren longitudes de separación de 5 o menos, siendo las más preferentes de 2 o menos. Alternativa y preferiblemente, dos secuencias de proteínas (o secuencias polipeptídicas derivadas de ellas de al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, como se utiliza este término la presente, si tienen una puntuación de alineación de más de 5 (en unidades de desviación estándar) utilizando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización de 6 o más. Véase Dayhoff, M.O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 101-110 (Volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y el Suplemento 2 de este volumen, pp. 1-10. Las dos secuencias o partes de las mismas son más
 20 preferiblemente homólogas si sus aminoácidos son mayores o iguales al 50% idénticos cuando se alinean de manera óptima utilizando el programa ALIGN. Debe apreciarse que pueden haber diferentes regiones de homología dentro de dos secuencias ortólogas. Por ejemplo, los sitios funcionales de ortólogos de ratón y humanos pueden tener un mayor grado de homología que las regiones no funcionales.

El término "corresponde a" se utiliza en la presente para indicar que una secuencia de polinucleótidos es homóloga (es decir, es idéntica, no está relacionada evolutivamente de forma estricta) a toda o una porción de una secuencia de polinucleótidos de referencia, o que una secuencia de polipéptidos es idéntica a una secuencia polipeptídica de referencia.
 30

En contraste, el término "complementario a" se utiliza en la presente para significar que la secuencia complementaria es homóloga a toda o a una parte de una secuencia de polinucleótidos de referencia. Para ilustrar, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".
 35

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos son idénticas (es decir, en una base de nucleótido por nucleótido o de residuo por residuo) sobre la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de manera óptima sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base del ácido nucleico es idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) o se produce un residuo de aminoácido en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones sobre la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de la secuencia. El término "identidad sustancial" como se utiliza en la presente denota una característica de un polinucleótido o secuencia de aminoácidos, en donde el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene al menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más preferible al menos el 99 por ciento de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótidos (6 aminoácidos), frecuentemente en una ventana de al menos 24 a 48 posiciones de nucleótidos (8 a 16 aminoácidos), en donde el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir deleciones o adiciones que suman el 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.
 40
 45
 50

Como se utiliza en la presente, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Véase Immunology - A Synthesis (2a Edition, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)). Los estereoisómeros (por ejemplo, los D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, los aminoácidos no naturales tales como α -, aminoácidos disustituidos en α -, los aminoácidos N-alquilo, el ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes apropiados para polipéptidos de la presente divulgación. Los ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxi prolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetil-lisina, ϵ -N-acetil-lisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxisilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxi prolina). En la notación de
 55
 60

polipéptidos utilizada en la presente, la dirección de la mano izquierda es la dirección del amino terminal y la dirección de la mano derecha es la dirección del carboxilo terminal, de acuerdo con el uso estándar y lo convencional.

De manera similar, a menos que se especifique lo contrario, el extremo izquierdo de las secuencias de polinucleótidos de cadena sencilla es el extremo 5'; la dirección de la izquierda de las secuencias de polinucleótidos de doble cadena se conoce como la dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' de transcripciones de ARN nacientes se conoce como la dirección de la transcripción; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 5' al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias río arriba"; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 3' al extremo 3' del transcrito de ARN se conocen como "secuencias río abajo".

Según se aplica a los polipéptidos, el término "identidad sustancial" se refiere a que dos secuencias peptídicas, cuando están alineadas de manera óptima, por acción de los programas GAP o BESTFIT que utilizan ponderaciones de espacios por defecto, comparten al menos el 80 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos el 90 por ciento de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos 95 por ciento de identidad de secuencia, y lo más preferible al menos 99 por ciento de identidad de secuencia. Preferiblemente, las posiciones de residuos que no son idénticas se diferencian por sustituciones conservativas de aminoácidos. Las sustituciones de aminoácidos conservativas se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos de sustitución de aminoácidos conservativos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutámico-aspártico y asparagina-glutamina.

Como se discute en la presente, se contemplan variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de las moléculas de inmunoglobulina o anticuerpos que se incluyen en la presente divulgación, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos aproximadamente el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, 90%, 95%, y lo más preferible, aproximadamente el 99% de identidad de secuencia con los anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina descritas en la presente. En particular, se contemplan sustituciones de aminoácidos conservativas. Los reemplazos conservativos son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que tienen cadenas laterales relacionadas. Los aminoácidos codificados genéticamente generalmente se dividen en familias: (1) ácido=aspartato, glutamato; (2) básico=lisina, arginina, histidina; (3) no polar=alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polar sin carga=glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Más preferiblemente, las familias son: la serina y la treonina son una familia hidroxil-alifática; la asparagina y la glutamina son una familia que contiene amida; alanina, valina, leucina e isoleucina son una familia alifática; y la fenilalanina, el triptófano y la tirosina son una familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido relacionado estructuralmente no tendrá un efecto importante sobre la función de unión o sobre las propiedades de la molécula resultante, especialmente si el reemplazo no involucra un aminoácido dentro del marco de referencia.

Si un cambio de aminoácido da como resultado un péptido funcional puede determinarse fácilmente analizando la actividad específica del derivado polipeptídico. Los ensayos se describen con detalle en la presente. Los expertos en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina. Los extremos amino y carboxilo preferidos de los fragmentos o análogos se encuentran cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales se pueden identificar mediante la comparación de los datos de la secuencia de nucleótidos y/o de los aminoácidos con las bases de datos de secuencias públicas o propietarias. Preferiblemente, los métodos de comparación computarizados se utilizan para identificar motivos de secuencia o dominios conformacionales de proteínas predichos que ocurren en otras proteínas de estructura y/o de función conocidas. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie et al., (1991) Science 253: 164. Por lo tanto, los ejemplos anteriores demuestran que los expertos en la técnica pueden reconocer secuencias de motivos y conformaciones estructurales que se pueden utilizar para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con los anticuerpos descritos en la presente.

En la presente también se describe un agente de unión dirigido o una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH que tiene al menos aproximadamente el 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o aproximadamente el 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VH de cualquiera de los anticuerpos mostrados en la Tabla 1, la lista de secuencias adjunta, un anticuerpo descrito en la presente, o con un HRDC (por ejemplo, HRDC1, HRDC2 o HRDC3) mostrados en la Tabla 8 o en la Tabla 29. El agente de unión a la diana o la molécula de anticuerpo también puede comprender un dominio VL que tiene al menos aproximadamente el 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o aproximadamente el 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VL cualquiera de los anticuerpos mostrados en la Tabla 1, la lista de secuencias adjunta, un anticuerpo descrito en la presente, o con un LRDC (por ejemplo, LRDC1, LRDC2 o LRDC3) mostrado en la Tabla 9 o en la Tabla 30. Los algoritmos que se pueden utilizar para calcular el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos comprenden, por ejemplo, BLAST (Altschul et al, (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), o el algoritmo de Smith-

Waterman (Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197), por ejemplo empleando parámetros por defecto. También se describe en la presente donde el agente de unión o el anticuerpo que comparte la identidad de secuencia de aminoácidos como se describe anteriormente, exhibe sustancialmente la misma actividad que los anticuerpos referenciados. Por ejemplo, sustancialmente la misma actividad comprende al menos una actividad que difiere de la actividad de los anticuerpos de referencia en no más de aproximadamente el 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1% o menos.

Un sitio de unión a antígeno generalmente está formado por los dominios de inmunoglobulina variable pesada (VH) y variable (VL), con la interfaz de unión al antígeno formada por seis bucles polipeptídicos de superficie, denominadas regiones determinantes de complementariedad (RDC). Hay tres RDC en cada VH (HRDC1, HRDC2, HRDC3) y en cada VL (LRDC1, LRDC2, LRDC3), junto con las regiones de marco (RM).

Típicamente, un dominio VH está apareado con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión al antígeno del anticuerpo, aunque un dominio VH o VL solo se puede utilizar para poder unirse al antígeno. El dominio VH (por ejemplo, de la Tabla 1) puede aparearse con el dominio VL (por ejemplo, de la Tabla 1), de manera que se forma un sitio de unión al antígeno de anticuerpo que comprende los dominios VH y VL. Esta divulgación se extiende a los otros dominios VH y VL descritos en la presente. También se describe en la presente donde las cadenas VH en la Tabla 8 o en la Tabla 29 están apareadas con un dominio VL heterólogo. La promiscuidad de la cadena ligera está bien establecida en la técnica. De nuevo, esta divulgación se extiende a los otros dominios VH y VL descritos en la presente. Por lo tanto, el VH del progenitor o de cualquiera de las cadenas de anticuerpos en la Tabla 9 o en la Tabla 30 puede aparearse con el VL del progenitor o de cualquiera de los anticuerpos en la Tabla 1 o con otro anticuerpo.

Un sitio de unión al antígeno puede comprender un conjunto de RDC de H y/o L del anticuerpo parental o cualquiera de los anticuerpos en la Tabla 1 con tantos como con veinte, dieciséis, diez, nueve o menos, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o cinco, adiciones, sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos dentro del conjunto divulgado de RDC H y/o L. Alternativamente, un sitio de unión al antígeno puede comprender un conjunto de RDC de H y/o L del anticuerpo parental o cualquiera de los anticuerpos que se describen en la Tabla 1 con hasta veinte, dieciséis, diez, nueve o menos, por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o cinco, sustituciones de aminoácidos dentro del conjunto divulgado de RDC H y/o L. Dichas modificaciones pueden realizarse potencialmente en cualquier residuo dentro del conjunto de RDC.

Las sustituciones de aminoácidos preferenciales son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos protéicos, (4) alteran las afinidades de unión, y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos análogos. Los análogos pueden incluir varias muteínas de una secuencia distinta de la secuencia peptídica que ocurre naturalmente. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (preferiblemente sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia natural (preferiblemente en la porción del polipéptido fuera del dominio (o dominios) que forma contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácidos conservativa no debe cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia principal (por ejemplo, un aminoácido de reemplazo no debe tender a romper una hélice que se produce en la secuencia parental, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caractericen a la secuencia parental). Ejemplos de polipéptidos reconocidos en la técnica de estructuras secundarias y terciarias se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., WH Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland). Publishing, New York, NY (1991) y Thornton et al. *Nature* 354: 105 (1991).

En la presente también se describe una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH que tiene al menos aproximadamente el 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o aproximadamente el 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VH de cualquiera de los anticuerpos enumerados en Tabla 1, la lista de secuencias adjunta o descrita en la presente, o con un HRDC (por ejemplo, HRDC1, HRDC2 o HRDC3) mostrado en la Tabla 8 o en la Tabla 29. La molécula de anticuerpo también puede opcionalmente comprender un dominio VL que tiene al menos el 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o el 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VL de cualquiera de los anticuerpos mostrados en la Tabla 1, la lista de secuencias adjunta o descrita en la presente, o con un LRDC (por ejemplo, LRDC1, LRDC2, o LRDC3) que se muestra en la Tabla 9 o en la Tabla 30. Los algoritmos que se pueden utilizar para calcular el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos comprenden, por ejemplo, BLAST (Altschul y otros, (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (Pearson y Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197), por ejemplo, empleando parámetros por defecto.

Las variantes de los dominios VH y VL y las RDCs de la presente divulgación, incluyendo aquellas para las que se exponen las secuencias de aminoácidos en la presente, y que se pueden emplear en agentes de direccionamiento y anticuerpos para $\alpha\text{V}\beta 6$ se pueden obtener por medio de métodos de alteración o mutación de la secuencia y selección para las dianas de los antígenos con las características deseadas. Los ejemplos de características deseadas incluyen, pero no se limitan a: afinidad de unión incrementada para antígeno con respecto a los anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno; aumento de la neutralización de la actividad antigénica con respecto a los anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno si se conoce la actividad; capacidad competitiva especificada con un anticuerpo o un ligando conocidos al antígeno en una proporción molar específica; capacidad de inmunoprecipitar el complejo; capacidad de unirse a un epítipo específico; epítipo lineal, por ejemplo la secuencia peptídica se identificó

utilizando la exploración de unión a un péptido como se describe en la presente, por ejemplo, utilizando péptidos cribados en conformación lineal y/o restringida; epítipo conformacional, formado por residuos no continuos; capacidad para modular una nueva actividad biológica de $\alpha V\beta 6$, o molécula río abajo. Tales métodos también se proporcionan en la presente.

- 5 Se pueden producir variantes de moléculas de anticuerpos descritos en la presente. Siguiendo la dirección de la química computacional en la aplicación de técnicas de análisis de datos multivariantes a las relaciones estructura/propiedad-actividad ((Wold, et al., *Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics -Mathematics and Statistics in Chemistry* (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984) se pueden derivar relaciones cuantitativas actividad-propiedad de los anticuerpos utilizando técnicas matemáticas bien conocidas, como
- 10 la regresión estadística, el reconocimiento de patrones y la clasificación ((Norman et al., *Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3rd edition* (April 1998); Kandel, Abraham & Backer, Eric. *Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995); Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective* (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (December 2000); Witten, Ian H. & Frank, Eibe. *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999); Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression* (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (July 2002); Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N. *Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery*). Las propiedades de los anticuerpos pueden derivarse de modelos empíricos y teóricos (por ejemplo, el análisis de posibles residuos de contacto o propiedades fisicoquímicas calculadas) de la secuencia de anticuerpos, estructuras funcionales y tridimensionales, y estas propiedades se pueden considerar individualmente y en combinación.

Un sitio de unión al antígeno de anticuerpo compuesto de un dominio VH y un dominio VL está formado típicamente por seis bucles de polipéptido: tres del dominio variable de cadena ligera (VL) y tres del dominio variable de cadena pesada (VH). El análisis de anticuerpos de estructura atómica conocida ha dilucidado las relaciones entre la secuencia y la estructura tridimensional de los sitios de combinación de anticuerpos. Estas relaciones implican que, a excepción de la tercera región (bucle) en los dominios VH, los bucles de sitios de enlace tienen una de un pequeño número de conformaciones de la cadena principal: son estructuras canónicas. Se ha demostrado que la estructura canónica formada en un bucle particular está determinada por su tamaño y por la presencia de ciertos residuos en los sitios clave tanto en el bucle como en las regiones de marco de referencia.

- 30 Este estudio de la relación secuencia-estructura se puede utilizar para la predicción de aquellos residuos en un anticuerpo de secuencia conocida, pero de una estructura tridimensional desconocida, que son importantes para mantener la estructura tridimensional de sus bucles de RDC y por lo tanto mantener la especificidad de unión. Estas predicciones se pueden respaldar comparando las predicciones con la salida de los experimentos de optimización principales. En un enfoque estructural, se puede crear un modelo de la molécula del anticuerpo utilizando cualquier paquete comercial o de libre disposición, como por ejemplo WAM. Posteriormente se puede utilizar un paquete de software de análisis y visualización de proteínas, como Insight II (Accelrys, Inc.) o Deep View, para evaluar posibles sustituciones en cada posición de la RDC. Esta información se puede utilizar para hacer sustituciones que probablemente tengan un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad.

40 Las técnicas requeridas para realizar sustituciones dentro de secuencias de aminoácidos de RDCs, dominios VH o VL de anticuerpos y/o agentes de unión están generalmente disponibles en la técnica. Se pueden realizar secuencias variantes, con sustituciones sobre las que se puede o no predecir un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad, y se puede probar su capacidad para unirse y/o neutralizar y/o para cualquier otra propiedad deseada.

45 Las variantes de la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se describen específicamente en la presente, pueden emplearse de acuerdo con la presente divulgación, como se discute.

El término "fragmento polipeptídico" como se utiliza en la presente se refiere a un polipéptido que tiene una delección en el amino terminal y/o en el carboxilo terminal, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia deducida que ocurre naturalmente, por ejemplo, a partir de una secuencia de ADNc de longitud completa. Los fragmentos típicamente tienen una longitud de al menos aproximadamente 5, 6, 8 o 10 aminoácidos, preferiblemente de al menos 14 aminoácidos, más preferiblemente de al menos 20 aminoácidos, usualmente de al menos 50 aminoácidos, e incluso más preferible, menor a 70 aminoácidos de longitud. El término "análogo", como se utiliza en la presente, se refiere a polipéptidos que comprenden un segmento de al menos 25 aminoácidos y que tiene una identidad sustancial con una porción de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene al menos una de las siguientes propiedades: (1) unión específica a $\alpha V\beta 6$, bajo condiciones de unión apropiadas, (2) capacidad para bloquear la unión apropiada de ligando/ $\alpha V\beta 6$, o (3) capacidad para inhibir la actividad de $\alpha V\beta 6$. Típicamente, los análogos de polipéptidos comprenden una sustitución de aminoácidos conservativa (o adición o delección) con respecto a la secuencia que ocurre naturalmente. Los análogos típicamente tienen una longitud de al menos 20 aminoácidos, preferiblemente una longitud de al menos 50 aminoácidos, y a menudo pueden ser tan largos como un polipéptido de longitud completa que ocurre naturalmente.

Los análogos de péptidos se utilizan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido del templado. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "péptidos miméticos" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS p.392 (1985); y Evans et al., J. Med. Chem. 30: 1229 (1987). Tales compuestos se desarrollan a menudo con la ayuda de modelos moleculares computarizados. Los péptidos miméticos que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles pueden utilizarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido paradigmático (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), como podría ser un anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente reemplazados por un enlace seleccionado del grupo que consiste en: -CH₂NH-, --CH₂S-, --CH₂-CH₂-, --CH=CH-(cis y trans), --COCH₂-, --CH(OH)CH₂-, y -CH₂SO-, por métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia de consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) se puede utilizar para generar péptidos más estables. Adicionalmente, los péptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica pueden generarse por métodos conocidos en la técnica (Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992)); por ejemplo, añadiendo internamente residuos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que puedan ciclar a el péptido.

Como se utiliza en la presente, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido o a un grupo de polipéptidos que comprenden al menos un dominio de unión que se forma a partir del plegamiento de cadenas de polipéptidos que tienen espacios de unión tridimensionales con formas de superficie internas y distribuciones de carga complementarias a las características de un determinante antigénico de un antígeno. Típicamente, un anticuerpo tiene una forma tetramérica, que comprende dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada uno de los pares tiene una cadena "ligera" y una "pesada". Las regiones variables de cada par de cadenas ligeras/pesadas forman un sitio de unión de anticuerpos.

Como se utiliza en la presente, un "agente de unión dirigido" es un agente, por ejemplo, un anticuerpo, o un fragmento de unión del mismo, que se une preferentemente a un sitio diana. También se describe en la presente donde el agente de unión dirigido es específico para un solo sitio diana. También se describe en la presente donde el agente de unión dirigido es específico para más de un sitio diana. En la presente también se describe en donde el agente de unión dirigido puede ser un anticuerpo monoclonal y el sitio diana puede ser un epítipo. Como se describe a continuación, un agente de unión dirigido puede comprender al menos un dominio de unión al antígeno de un anticuerpo, en el que dicho dominio está fusionado o contenido dentro de una proteína heteróloga.

Los "fragmentos de unión" de un anticuerpo se producen mediante técnicas de ADN recombinante, o por escisión enzimática o por escisión química de anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y anticuerpos de cadena única. Se entiende que un anticuerpo distinto a un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un anticuerpo inhibe sustancialmente la adhesión de un receptor a un contra-receptor cuando un exceso de anticuerpo reduce la cantidad de receptor unido al contra-receptor en al menos el 20%, 40%, 60% u 80%, y generalmente más que el 85% (como se midió en un ensayo de unión competitiva *in vitro*).

Un anticuerpo puede ser oligoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado en RDC, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo catalítico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo antiidiotípico y anticuerpos que se pueden marcar en forma soluble o unida, así como fragmentos, variantes o derivados de los mismos, ya sea solos o en combinación con otras secuencias de aminoácidos proporcionadas por técnicas conocidas. Un anticuerpo puede ser de varias especies. El término anticuerpo también incluye fragmentos de unión de los anticuerpos de la divulgación; Los ejemplos de fragmentos incluyen Fv, Fab, Fab', anticuerpo monocatenario (svFC), región variable dimérica (Diabody) y región variable estabilizada con disulfuro (dsFv).

Se ha demostrado que fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de los antígenos de unión. Los ejemplos de fragmentos de unión son (Ward, E.S. y col., (1989) Nature 341, 544-546) el fragmento Fab que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1; (McCafferty et al., (1990) Nature, 348, 552-554) el fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH1; (Holt et al., (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490) el fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward, ES et al., Nature 341, 544-546 (1989), McCafferty et al., (1990) Nature, 348, 552-554, Holt et al., (2003) Trends in Biología 21, 484-490], que consta de un dominio VH o VL; (v) regiones RDC aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) Fv de cadena sencilla moléculas (scFv), en donde un dominio VH y un dominio VL están enlazados por un enlace peptídico que permite que ambos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno (Bird et al., (1988) Science, 242, 423-426, Huston et al., (1988) PNAS USA, 85, 5879-5883); (viii) dímeros Fv de cadena simple biespecíficos (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos contruidos por la fusión de genes (WO94/13804; Holliger, P. (1993) et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448). Las moléculas de Fv, scFv o diacuerpo pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen a la VH con los dominios VL (Reiter, Y. et al., Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996). También se pueden fabricar minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (Hu, S. et al., (1996) Cancer Res., 56, 3055-3061). Otros ejemplos de fragmentos de unión son Fab', que difiere de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada, que incluye una o más cisteínas de la región

bisagra del anticuerpo, y Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el que el o los residuos de cisteína de los dominios constantes tienen un grupo tiol libre.

El término "epítope" incluye a cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de células T. Los determinantes de epítopes generalmente consisten en grupos de moléculas químicamente activas de superficie tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y pueden, pero no siempre, tener características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$, preferiblemente $\leq 100 \text{ nM}$ y lo más preferible $\leq 10 \text{ nM}$.

El término "agente" se utiliza en la presente para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos.

"Activo" o "actividad" con respecto a un polipéptido heterodimérico $\alpha\text{V}\beta 6$ se refiere a la porción de un polipéptido heterodimérico $\alpha\text{V}\beta 6$ que tiene la actividad biológica o inmunológica de un polipéptido nativo $\alpha\text{V}\beta 6$. "Biológico" cuando se utiliza en la presente se refiere a una función biológica que resulta de la actividad del polipéptido nativo $\alpha\text{V}\beta 6$. Una actividad biológica de $\alpha\text{V}\beta 6$ preferida incluye, por ejemplo, la adhesión celular inducida por $\alpha\text{V}\beta 6$.

"Mamífero" cuando se utiliza en la presente se refiere a cualquier animal que se considera un mamífero. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

La digestión de anticuerpos con la enzima, papaína, da como resultado dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, también conocidos como fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc", que no tiene actividad de unión al antígeno pero que tiene la capacidad de cristalizar. La digestión de los anticuerpos con la enzima, pepsina, da como resultado un fragmento $\text{F}(\text{ab}')_2$ en el que los dos brazos de la molécula del anticuerpo permanecen unidos y comprenden sitios de unión a dos antígenos. El fragmento $\text{F}(\text{ab}')_2$ tiene la capacidad de entrecruzar a el antígeno.

"Fv" cuando se utiliza en la presente se refiere al fragmento mínimo de un anticuerpo que retiene tanto a los sitios de reconocimiento del antígeno como los sitios de unión al antígeno.

"Fab" cuando utiliza en la presente se refiere al fragmento de un anticuerpo que comprende a el dominio constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

El término "mAb" se refiere al anticuerpo monoclonal.

"Liposoma" cuando se utiliza en la presente se refiere a una pequeña vesícula que puede ser útil para el suministro de fármacos que pueden incluir a el polipéptido $\alpha\text{V}\beta 6$ de la divulgación o anticuerpos contra dicho polipéptido $\alpha\text{V}\beta 6$ para un mamífero.

"Etiqueta" o "etiquetado" como se utiliza en la presente se refiere a la adición de un resto detectable a un polipéptido, por ejemplo, una etiqueta radioactiva, una etiqueta fluorescente, una etiqueta enzimática quimioluminiscente marcada o un grupo biotínico. Los radioisótopos o radionúclidos pueden incluir ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , los marcadores fluorescentes pueden incluir rodamina, lantánidos fosforados o FITC y los marcadores enzimáticos pueden incluir peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, luciferasa, alcalina fosfatasa.

Las etiquetas adicionales incluyen, a modo de ilustración y no de limitación: enzimas, tales como glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH"), alfa-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa, lisozima, malato deshidrogenasa y peroxidasa; tintes; los marcadores fluorescentes adicionales o los fluorescentes tales como la fluoresceína y sus derivados, fluorocromo, GFP (GFP por sus siglas "Green Fluorescent Protein"), dansilo, umbeliferona, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescina; fluoróforos tales como criptatos de lantánidos y quelatos, por ejemplo, Europio, etcétera (Perkin Elmer y Cis Biointernational); etiquetas quimioluminiscentes o quimioluminiscentes, tales como isoluminol, luminol y los dioxetanos; sensibilizadores coenzimas; sustratos enzimáticos; partículas, tales como partículas de látex o de carbono; sol de metal, cristalita liposomas; células, etcétera, que pueden marcarse adicionalmente con un tinte, catalizador u otro grupo detectable; moléculas tales como biotina, digoxigenina o 5-bromodeoxiuridina; remanentes de toxina, como por ejemplo un resto de toxina seleccionado de un grupo de exotoxina de Pseudomonas (PE o un fragmento citotóxico o mutante del mismo), toxina de la difteria o un fragmento citotóxico o mutante de la misma, una toxina botulínica A, B, C, D, E o F, ricina o uno de sus fragmentos citotóxicos, por ejemplo, ricina A, abrina o un fragmento citotóxico de la misma, saporina o un fragmento citotóxico de la misma, toxina antiviral *peeweed* o un fragmento citotóxico de la misma y briodina 1 o un fragmento citotóxico de la misma.

El término "agente o medicamento farmacéutico", como se utiliza en la presente, se refiere a un compuesto químico o a una composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente. Otros términos de química en la presente se utilizan de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como se ilustra en The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Como se utiliza en la presente, "sustancialmente pura" se refiere a que una especie objeto es la especie predominantemente presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en

la composición), y preferiblemente una fracción sustancialmente purificada es una composición en donde la especie objeto comprende, al menos, aproximadamente el 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. En general, una composición sustancialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferiblemente más del 85%, 90%, 95% y 99%. Más preferiblemente, la especie objeto se purifica hasta la homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante métodos de detección convencionales), en donde la composición consiste esencialmente en una sola especie macromolecular.

El término "paciente" incluye a sujetos humanos y a sujetos veterinarios.

Anticuerpos humanos y Humanización de anticuerpos

Los anticuerpos humanos evitan algunos de los problemas asociados con los anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes murinas o de rata. La presencia de tales proteínas derivadas de ratas o murinas puede conducir a la rápida eliminación de los anticuerpos o puede conducir a la generación de una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo por parte del paciente. Para evitar la utilización de anticuerpos murinos o derivados de rata, se pueden generar anticuerpos completamente humanos a través de la introducción de loci de anticuerpos humanos funcionales en un roedor, otro mamífero o animal, de tal manera que el roedor, otro mamífero o animal es capaz de producir anticuerpos completamente humanos.

Un método para generar anticuerpos completamente humanos es mediante el uso de cepas de ratón Xenomouse® que se han diseñado para contener hasta fragmentos de la línea germinal humana de hasta 1000 kb del locus de la cadena pesada humana y del locus de cadena ligera kappa. Véase Mendez et al., Nature Genetics 15: 146-156 (1997) y Green and Jakobovits J. Exp. Medicina. 188: 483-495 (1998). Las cepas Xenomouse® están disponibles en Amgen, Inc. (Fremont, CA).

La producción de las cepas de ratón Xenomouse® se describe y se delimita más detalladamente en la solicitud de patente EE.UU con números de serie 07/466,008, presentada el 12 de enero de 1990, 07/610,515, presentada el 8 de noviembre de 1990, 07/919,297, presentada el 24 de julio de 1992, 07/922,649, presentada el 30 de julio de 1992, 08/031,801, presentada el 15 de marzo de 1993, 08/112,848, presentada el 27 de agosto de 1993, 08/234,145, presentada el 28 de abril de 1994, 08/376,279, presentada el 20 de enero de 1995, 08/430, 938, presentada el 27 de abril de 1995, 08/ 464,584, presentada el 5 de junio de 1995, 08/ 464,582, presentada el 5 de junio de 1995, 08/463,191, presentada el 5 de junio de 1995, 08/ 462,837, presentada el 5 de junio de 1995, 08/ 486,853, presentada el 5 de junio de 1995, 08/ 486,857, presentada el 5 de junio de 1995, 08/486,859, presentada el 5 de junio de 1995, 08/462,513, presentada el 5 de junio de 1995, 08/724,752, presentada el 2 de octubre de 1996, 08/ 759,620, presentada el 3 de diciembre de 1996, Publicación EE.UU 2003/0093820, presentada el 30 de noviembre de 2001 y las Patentes de EE.UU 6,162,963, 6,150,584, 6,114,598, 6,075,181 y 5,939,598 y las patentes Japonesas No. 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 y 3 068 507 B2. Véase también la Patente Europea No. EP 0 463 151 B1, subvención publicada el 12 de junio de 1996, Solicitud de Patente Internacional No. WO 94/02602, publicada el 3 de febrero de 1994, Solicitud Internacional de Patente No. WO 96/34096, publicada el 31 octubre de 1996, WO 98/24893, publicado el 11 de junio de 1998, WO 00/76310, publicado el 21 de diciembre de 2000.

En un enfoque alternativo, otros, incluyendo GenPharm International, Inc., han utilizado un enfoque de "minilocus". En el enfoque de minilocus, un locus de Ig exógeno se imita mediante la inclusión de piezas (genes individuales) del locus de Ig. Por lo tanto, uno o más genes V_H, uno o más genes D_H, uno o más genes J_H, una región constante mu, y generalmente una segunda región constante (preferiblemente una región constante gamma) se forman en una construcción para la inserción a un animal. Este enfoque se describe en la Patente de EE.UU No. 5,545,807 de Surani et al., y en las Patentes de EE.UU No. 5,545,806, 5,625,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,66,016, 5,770,429, 5,789,450, 5,814,318, 5,877,397, 5,874,299 y 6,255,429 de cada uno de ellos. Patente de EE. UU. No. 5,591,669 y 6,023,010 de Krimpenfort y Berns, Patentes de EE. UU. No. 5,612,205, 5,721,367 y 5,789,215 de Berns et al., y Patente de EE. UU. No. 5,643,763 de Choi y Dunn, y GenPharm Solicitud de patente internacional de EE. UU. No. 07/574,748, presentada el 29 de agosto de 1990, 07/575,962, presentada el 31 de agosto de 1990, 07/810,279, presentada el 17 de diciembre de 1991, 07/853,408, presentada el 18 de marzo de 1992, 07/904,068, presentada el 23 de junio de 1992, 07/990,860, presentada el 16 de diciembre de 1992, 08/053,131, presentada el 26 de abril de 1993, 08/096,762, presentada el 22 de julio de 1993, 08/155,301, presentada el 18 de noviembre de 1993, 08/161,739, presentada el 3 de diciembre de 1993, 08/165,699, presentada el 10 de diciembre de 1993, 08/209.741, presentada el 9 de marzo de 1994. Véase también la Patente Europea No. 0 546 073 B1, Solicitud de Patente Internacional No. WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, y WO 98/24884 y patente de EE. UU. No. 5,981,175. Véase además Taylor et al., 1992, Chen et al., 1993, Tuailon et al., 1993, Choi et al., 1993, Lonberg et al., (1994), Taylor et al., (1994) y Tuailon. et al., (1995), Fishwild et al., (1996).

Kirin también ha demostrado la generación de anticuerpos humanos de ratones en los que, a través de la fusión de microcélulas, se han introducido grandes fragmentos de cromosomas o cromosomas completos. Véase la Solicitud de Patente Europea No. 773 288 y 843 961. Además, se han generado ratones KMTM, que son el resultado del cruce de los ratones Tc de Kirin con ratones minilocus (Humab) de Medarex. Estos ratones poseen el transcromosoma de IgH humana de los ratones Kirin y el transgén de la cadena kappa de los ratones Genpharm (Ishida et al., Cloning Stem Cells, (2002) 4: 91-102).

Los anticuerpos humanos también pueden derivarse por métodos *in vitro*. Los ejemplos apropiados incluyen, entre otros, la presentación de fagos (CAT, Morphosys, Dyax, Biosite/Medarex, Xoma, Symphogen, Alexion (anteriormente Proliferon), Affimed), la presentación de ribosomas (CAT), la presentación de levaduras y similares.

Preparación de Anticuerpos

5 Los anticuerpos, como se describen en la presente, se prepararon mediante la utilización de la tecnología Xenomouse®, como se describe a continuación. Dichos ratones, entonces, son capaces de producir moléculas de inmunoglobulina humana y anticuerpos y son deficientes en la producción de moléculas de inmunoglobulina murina y anticuerpos. Las tecnologías utilizadas para lograr lo mismo se describen en las patentes, solicitudes y referencias que se describen en la sección de antecedentes de la presente. Sin embargo, en particular, la producción transgénica de ratones y anticuerpos a partir de los mismos se describe en la Solicitud de Patente de EE. UU. No. 08/759,620, presentada el 3 de diciembre de 1996 y en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998 y la WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre de 2000. Véase también Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997).

15 Mediante el uso de dicha tecnología, se han producido anticuerpos monoclonales completamente humanos para una variedad de antígenos. Esencialmente, las líneas de ratones Xenomouse® se inmunizan con un antígeno de interés (por ejemplo, $\alpha\text{V}\beta 6$), las células linfáticas (como las células B) se recuperan de los ratones hiperinmunizados, y los linfocitos recuperados se fusionan con una línea celular de tipo mieloide para preparar líneas celulares de hibridoma inmortales. Estas líneas celulares de hibridoma se van a cribar y posteriormente seleccionar para identificar líneas celulares de hibridoma que produzcan anticuerpos específicos para el antígeno de interés. En el presente documento se proporcionan métodos para la producción de múltiples líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para $\alpha\text{V}\beta 6$. Adicionalmente, en la presente se proporciona la caracterización de los anticuerpos producidos por dichas líneas celulares, incluyendo los análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras de dichos anticuerpos.

25 Alternativamente, en lugar de fusionarse con células de mieloma para generar hibridomas, las células B pueden analizarse directamente. Por ejemplo, las células B CD19+ se pueden aislar de ratones hiperinmunes Xenomouse® y permitir que proliferen y se diferencien en células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Los anticuerpos de los sobrenadantes celulares se seleccionan luego mediante ELISA para determinar su reactividad frente al inmunógeno $\alpha\text{V}\beta 6$. Los sobrenadantes también se pueden examinar para determinar la inmunorreactividad frente a fragmentos de $\alpha\text{V}\beta 6$ para mapear aún más los diferentes anticuerpos para la unión a dominios de interés funcional en $\alpha\text{V}\beta 6$. Los anticuerpos también pueden analizarse contra otras integrinas humanas relacionadas y contra la rata, el ratón y los primates no humanos, como el mono cangrejero, ortólogos de $\alpha\text{V}\beta 6$, el último para determinar la reactividad cruzada de las especies. Las células B de los pocillos que contienen a los anticuerpos de interés se pueden immortalizar mediante diversos métodos, incluida la fusión para crear hibridomas de pocillos individuales o combinados, o mediante infección con EBV o transfección mediante genes inmortalizadores conocidos y posteriormente se colocan en el medio apropiado. Alternativamente, las células plasmáticas individuales que secretan anticuerpos con las especificidades deseadas se aíslan posteriormente utilizando un ensayo de placa hemolítica específica para $\alpha\text{V}\beta 6$ (véase por ejemplo Babcook et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-48 (1996)). Las células objetivo de la lisis son preferiblemente glóbulos rojos de oveja (GROs) recubiertos con el antígeno $\alpha\text{V}\beta 6$.

40 En presencia de un cultivo de células B que contiene células plasmáticas que secretan la inmunoglobulina de interés y el complemento, la formación de una placa indica una lisis específica mediada por $\alpha\text{V}\beta 6$ de los glóbulos rojos de la oveja que rodean a la célula de plasma de interés. La única célula plasmática específica de antígeno en el centro de la placa se puede aislar y la información genética que codifica para la especificidad del anticuerpo se aísla de la célula plasmática única. Utilizando la transcripción reversa seguida por PCR (RT-PCR), se puede clonar el ADN que codifica para las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo. Dicho ADN clonado puede luego insertarse adicionalmente en un vector de expresión apropiado, preferiblemente un vector de casete tal como un pcDNA, más preferiblemente tal vector pcDNA que contiene los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina. El vector generado puede luego transfectarse en células huésped, por ejemplo, células HEK293, células CHO, y cultivarse en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para inducir la transcripción, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican para las secuencias deseadas.

50 En general, los anticuerpos producidos por los hibridomas fusionados eran cadenas pesadas de IgG2 humanas con cadenas ligeras kappa o lambda completamente humanas. Los anticuerpos descritos en la presente poseen cadenas pesadas de IgG4 humanas, así como cadenas pesadas de IgG2. Los anticuerpos también pueden ser de otros isotipos humanos, incluyendo IgG1. Los anticuerpos poseían afinidades altas, típicamente poseen una Kd de aproximadamente 10^{-6} hasta aproximadamente 10^{-12} M o inferior, cuando se miden mediante técnicas de fase sólida y fase de solución. Se prefieren a los anticuerpos que poseen una Kd de al menos 10^{-11} M para inhibir la actividad de $\alpha\text{V}\beta 6$.

60 Como se apreciará, los anticuerpos pueden expresarse en líneas celulares distintas que de las líneas celulares de hibridoma. Pueden utilizarse secuencias que codifican para anticuerpos particulares para transformar una célula huésped de mamífero apropiada. La transformación puede ser por cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluido, por ejemplo, empaquetamiento del polinucleótido en un virus (o en un

vector viral) y transducir a una célula huésped con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, como se ejemplifica en las patentes de EE.UU. No. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461 y 4,959,455. El procedimiento de transformación utilizado depende del huésped a transformar. Los métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamíferos son bien conocidos en la técnica e incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación del polinucleótido(s) en liposomas y microinyección directa del ADN al núcleo.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadores para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), que incluyen, pero no se limitan a, células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células de riñón epitelial humano 293 y varias otras líneas celulares. Las líneas celulares de preferencia en particular se seleccionan determinando qué líneas celulares tienen altos niveles de expresión y producen anticuerpos con propiedades de unión a $\alpha\text{V}\beta 6$ constitutivas.

Con base en la capacidad de los mAbs para neutralizar significativamente la actividad de $\alpha\text{V}\beta 6$ (como se demuestra en los ejemplos que se exponen a continuación), estos anticuerpos tendrán efectos terapéuticos en el tratamiento de síntomas y afecciones resultantes de la expresión de $\alpha\text{V}\beta 6$. También se divulga en la presente donde los anticuerpos y los métodos aquí presentados se relacionan con el tratamiento de los síntomas resultantes de la adhesión celular inducida por $\alpha\text{V}\beta 6$ o la señalización inducida como resultado de la interacción de $\alpha\text{V}\beta 6$ con sus ligandos.

También se describe en la presente una composición farmacéutica que comprende a un antagonista de la actividad biológica de $\alpha\text{V}\beta 6$, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se describe en la presente donde el antagonista comprende a un anticuerpo. En la presente también se describe una composición farmacéutica que comprende a un antagonista de la actividad biológica de $\alpha\text{V}\beta 6$, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se describe en la presente donde el antagonista comprende a un anticuerpo.

Los anticuerpos anti- $\alpha\text{V}\beta 6$ son útiles en la detección de $\alpha\text{V}\beta 6$ en muestras de pacientes y, en consecuencia, son útiles como diagnósticos para estados de enfermedad como se describe en la presente. Adicionalmente, en función de su capacidad para inhibir significativamente la actividad de $\alpha\text{V}\beta 6$ (como se demuestra en los ejemplos que se exponen a continuación), los anticuerpos anti- $\alpha\text{V}\beta 6$ tienen efectos terapéuticos en el tratamiento de síntomas y afecciones que resultan de la expresión de $\alpha\text{V}\beta 6$. También se describe en la presente donde los anticuerpos y los métodos en este documento se refieren al tratamiento de los síntomas que resultan de la adhesión celular inducida por $\alpha\text{V}\beta 6$. En la presente también se describen métodos para utilizar a los anticuerpos y métodos descritos en la presente para tratar una enfermedad o un trastorno relacionado con $\alpha\text{V}\beta 6$ incluyendo enfermedades neoplásicas, como melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), tumor de tiroides, cáncer gástrico (estómago), cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de colon y cáncer de páncreas.

Administración Terapéutica y Formulaciones

En la presente también se describen formulaciones farmacéuticas estériles de anticuerpos anti- $\alpha\text{V}\beta 6$ que son útiles para el tratamiento de enfermedades. Dichas formulaciones inhibirían la unión de los ligandos a la integrina $\alpha\text{V}\beta 6$, por lo tanto tratarían efectivamente las condiciones patológicas en las que, por ejemplo, el tejido $\alpha\text{V}\beta 6$ está anormalmente elevado. Los anticuerpos anti- $\alpha\text{V}\beta 6$ preferiblemente poseen una afinidad adecuada para inhibir potentemente la actividad de $\alpha\text{V}\beta 6$, y preferiblemente tienen una duración de acción adecuada para permitir una dosificación infrecuente en seres humanos. Una duración prolongada de la acción permitirá programas de dosificación menos frecuentes y más convenientes por vías parenterales alternativas, como la inyección subcutánea o intramuscular.

Las formulaciones estériles se pueden crear, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y reconstitución del anticuerpo. El anticuerpo normalmente se almacenará en forma liofilizada o en solución. Las composiciones de anticuerpos terapéuticos generalmente se colocan en un contenedor que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un adaptador que permite la recuperación de la formulación, como un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

La vía de administración del anticuerpo está de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intratecal, inhalación o intralesional, inyección directa en el sitio del tumor o por vía sostenida como se describe a continuación. sistemas de liberación como se indica a continuación. El anticuerpo se administra preferiblemente de forma continua por infusión o por inyección en bolo.

Una cantidad efectiva de anticuerpo a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración y la condición del paciente. Por consiguiente, se prefiere que el terapeuta titule la dosis y modifique la vía de administración según sea necesario para obtener el efecto terapéutico óptimo. Típicamente, el médico administrará el anticuerpo hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado. El

progreso de esta terapia se monitorea fácilmente mediante ensayos convencionales o mediante los ensayos descritos en este documento.

Los anticuerpos, como se describe en la presente, se pueden preparar en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición terapéutica se puede administrar por vía intravenosa o a través de la nariz o el pulmón, preferiblemente como un aerosol líquido o en polvo (liofilizado). La composición también se puede administrar por vía parenteral o subcutánea según se desee. Cuando se administra de forma sistémica, la composición terapéutica debe estar estéril, libre de pirógenos y en una solución parenteralmente aceptable que tenga en cuenta el pH, la isotonicidad y la estabilidad. Estas condiciones son conocidas por los expertos en la técnica. Brevemente, las formulaciones de dosificación de los compuestos descritos en la presente se preparan para su almacenamiento o su administración mezclando el compuesto que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables. Dichos materiales no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como TRIS HCl, fosfato, citrato, acetato y otras sales de ácidos orgánicos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; péptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos), péptidos como poliarginina, proteínas, como la albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo a la celulosa o a sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones como el sodio y/o tensioactivos no iónicos como TWEEN, PLURONICS o polietilenglicol.

Las composiciones estériles para inyectar pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional como se describe en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed, Lippincott Williams & Wilkins Publishers (2003)). Por ejemplo, la disolución o suspensión del compuesto activo en un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como agua o aceite vegetal natural como el aceite de sésamo, maní o algodón o un vehículo graso sintético como el oleato de etilo o similares. Se pueden incorporar tampones, conservadores, antioxidantes y similares de acuerdo con la práctica farmacéutica aceptada.

Los ejemplos apropiados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen a el polipéptido, dichas matrices están en forma de artículos conformados, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (metacrilato de 2-hidroxietilo) como se describe por Langer et al., J. Biomed Mater. Res., (1981) 15: 167-277 y Langer, Chem. Tech., (1982) 12: 98-105, o poli (vinilalcohol)), polilactidas (Patente EE.UU No. 3,773,919, EP 58,881), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al. al., Biopolymers, (1983) 22: 547-556), etileno-acetato de vinilo no degradable (Langer et al., supra), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico no degradables como LUPRON Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida, y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico (EP 133,988).

Mientras que los polímeros como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan a las proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante mucho tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que resulta en una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización de proteínas dependiendo del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlace S-S intermolecular a través del intercambio de disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilizando soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Los anticuerpos descritos en la presente también abarcan anticuerpos que tienen vidas medias (por ejemplo, vidas medias en suero) en un mamífero, preferiblemente un ser humano, mayor que el de un anticuerpo no modificado. También se describe en la presente donde la vida media del anticuerpo es mayor que 15 días, mayor que 20 días, mayor que 25 días, mayor que 30 días, mayor que 35 días, mayor que 40 días, mayor que 45 días, mayor que 2 meses, mayor que 3 meses, mayor que 4 meses o mayor que 5 meses. El aumento de las vidas medias de los anticuerpos de la presente o fragmentos de los mismos en un mamífero, preferiblemente un ser humano, da como resultado una titulación en suero más alta de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en el mamífero, y por lo tanto, reduce la frecuencia de la administración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y/o reducen la concentración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a administrar. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos que tienen vidas medias *in vivo* aumentadas pueden generarse mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de los mismos con vidas medias *in vivo* aumentadas pueden generarse modificando (por ejemplo, sustituyendo, deletando o añadiendo) residuos de aminoácidos identificados como involucrados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo, Publicaciones Internacionales No. WO 97/34631 y WO 02/060919). Los anticuerpos o fragmentos de los mismos con vidas medias *in vivo* aumentadas pueden generarse por la unión a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, de moléculas de polímeros tales como polietilenglicol de alto peso molecular (PEG). El PEG puede unirse a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con o sin un enlacen multifuncional, ya sea a través de la conjugación específica del sitio del PEG al extremo N- o C- de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, o a través de grupos épsilon-amino presentes en los residuos de lisina. Se utilizará una derivación polimérica lineal o ramificada que resulte en una pérdida mínima de la actividad biológica. El grado de conjugación se controlará de cerca por SDS-PAGE y espectrometría de

masas para asegurar la conjugación apropiada de las moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG sin reaccionar se puede separar de los conjugados anticuerpo-PEG mediante, por ejemplo, exclusión por tamaño o cromatografía de intercambio iónico.

5 Las composiciones de liberación sostenida también incluyen preparaciones de cristales del anticuerpo suspendidos en formulaciones apropiadas capaces de mantener cristales en suspensión. Estas preparaciones cuando se inyectan por vía subcutánea o intraperitoneal pueden producir un efecto de liberación sostenida. Otras composiciones también incluyen anticuerpos atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen dichos anticuerpos se preparan por métodos conocidos *per se*: Patente de EE.UU. No. DE 3,218,121; Epstein et al., Proc. Natl Acad Sci. USA, (1985) 82: 3688-3692; Hwang et al, Proc. Natl Acad Sci. USA, (1980) 77: 4030-4034; EP 52,322; EP 36.676; EP 88.046; EP 10 143,949; 142,641; Solicitud de patente japonesa 83-118008; Patente de EE.UU. No. 4,485,045 y 4,544,545; y EP 102,324.

15 La dosis de la formulación de anticuerpo para un paciente determinado será determinada por el médico a cargo teniendo en cuenta varios factores conocidos por modificar la acción de los medicamentos, incluida la gravedad y el tipo de enfermedad, el peso corporal, el sexo, la dieta, el tiempo y la vía de administración, otros medicamentos y otros factores clínicos relevantes. Las dosis terapéuticamente efectivas se pueden determinar por métodos *in vitro* o *in vivo*.

20 Una cantidad eficaz de los anticuerpos, descritos en la presente, para ser empleados terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la vía de administración y la condición del paciente. Por consiguiente, se prefiere que el terapeuta titule la dosis y modifique la vía de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis diaria típica puede oscilar entre aproximadamente 0,001 mg/kg y hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Típicamente, el médico administrará el anticuerpo terapéutico hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante ensayos convencionales o como se describe en este documento.

25 Se apreciará que la administración de entidades terapéuticas de acuerdo con las composiciones y métodos en el presente documento se administrará con vehículos apropiados, excipientes y otros agentes que se incorporan en formulaciones para proporcionar una transferencia, administración, tolerancia y similares. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, jaleas, ceras, aceites, lípidos, lípidos (catiónicos o aniónicos) que contienen vesículas (como Lipofectin™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidras, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y 30 mezclas semisólidas que contienen carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias de acuerdo con la presente divulgación, siempre que el ingrediente activo en la formulación no sea inactivado por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véase también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol. Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery- 35 some emerging concepts." J Pharm Sci .89(8):967-78 (2000), Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) y las citas en estos para obtener información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

Diseño y Generación de Otros Terapéuticos

40 De acuerdo con la presente divulgación y basándose en la actividad de los anticuerpos que se producen y caracterizan en este documento con respecto a $\alpha\text{V}\beta 6$, se facilita el diseño de otras modalidades terapéuticas más allá de los restos de anticuerpos. Dichas modalidades incluyen, sin limitación, terapias de anticuerpos avanzadas, como anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas y terapias radiomarcadas, anticuerpos de un solo dominio, generación de terapias peptídicas, dominios de unión de $\alpha\text{V}\beta 6$ en andamios novedosos, terapias genéticas, anticuerpos particulares, terapias 45 antisentido y pequeñas moléculas.

En relación con la generación de terapias avanzadas de anticuerpos, donde la fijación del complemento es un atributo deseable, puede ser posible eludir la dependencia del complemento para la muerte celular mediante el uso de anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas o radiomarcadores, por ejemplo.

50 Pueden generarse anticuerpos biespecíficos que comprenden (i) dos anticuerpos, uno con una especificidad para $\alpha\text{V}\beta 6$ y otro con una segunda molécula que se conjugan entre sí, (ii) un único anticuerpo que tiene una cadena específica para $\alpha\text{V}\beta 6$ y una segunda cadena específica a una segunda molécula, o (iii) un anticuerpo de cadena sencilla que tiene especificidad por $\alpha\text{V}\beta 6$ y por la otra molécula. Dichos anticuerpos biespecíficos pueden generarse utilizando técnicas que son bien conocidas; por ejemplo, en relación con (i) y (ii) véase, por ejemplo, Fanger et al., Immunol Methods 4: 72-81 (1994) y Wright and Harris, *supra*. y en relación con (iii) véase, por ejemplo, Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7: 51-52 (1992). En cada caso, se puede hacer la segunda especificidad a los receptores 55 de activación de la cadena pesada, incluyendo, sin limitarse, a CD16 o CD64 (véase, por ejemplo, Deo et al., Immunol. Today 18: 127 (1997)) o CD89 (véase por ejemplo, Valerius et al., Blood 90: 4485-4492 (1997)).

En relación con las inmunotoxinas, los anticuerpos pueden modificarse para actuar como inmunotoxinas utilizando protocolos que son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Vitetta Immunol Today 14: 252 (1993). Véase también la patente de EE.UU. No. 5,194,594. En relación con la preparación de anticuerpos radiomarcados, dichos anticuerpos modificados también pueden prepararse fácilmente utilizando protocolos que son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Junghans et al., En Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Véanse también las patentes de EE.UU. No. 4,681,581, 4,735,210, 5,101,827, 5,102,990 (RE 35,500), 5,648,471 y 5,697,902.

Se puede proporcionar un sitio de unión al antígeno mediante la disposición de las RCDs en andamios de proteínas que no son anticuerpos, como fibronectina o citocromo B, etcétera. (Haan y Maggos (2004) BioCentury, 12 (5): A1-A6; Koide et al., (1998) Journal of Molecular Biology, 284: 1141-1151; Nygren et al., (1997) Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469) o aleatorizando o mutando los residuos de aminoácidos de un bucle dentro de un andamio de proteínas para conferir especificidad de unión para la diana deseada. Nygren et al., (1997) Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469) han revisado en detalle los andamios para diseñar nuevos sitios de unión a proteínas. Los andamios proteicos para imitadores de anticuerpos se describen en WO/0034784, en donde los inventores describen proteínas (imitadores de anticuerpos) que incluyen un dominio de tipo III de fibronectina que tiene al menos un bucle aleatorio. Un andamio adecuado en el que se injertan una o más RCD, por ejemplo, un conjunto de dominios de la superfamilia de genes de inmunoglobulina puede proporcionar un conjunto de HRCD. El andamio puede ser una proteína humana o no humana. La ventaja de un andamio de proteínas que no son anticuerpos es que puede proporcionar un sitio de unión al antígeno en una molécula de andamio que es más pequeña y/o más fácil de fabricar que al menos algunas moléculas de anticuerpo. El pequeño tamaño de un agente de unión puede conferir propiedades fisiológicas útiles, tales como la capacidad de entrar en las células, penetrar profundamente en los tejidos o alcanzar objetivos dentro de otras estructuras, o unirse dentro de las cavidades de proteínas del antígeno diana. El uso de sitios de unión a los antígenos en andamios de proteínas que no son anticuerpos se revisa en Wess, 2004 (Wess, L. En: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7, 2004). Son típicas las proteínas que tienen un esqueleto estable y uno o más bucles variables, en los que la secuencia de aminoácidos del bucle o bucles se muta específica o aleatoriamente para crear un sitio de unión al antígeno que se une al antígeno diana. Dichas proteínas incluyen los dominios de unión a IgG de la proteína A de *S. aureus*, transferrina, albúmina, tetranectina, fibronectina (por ejemplo, décimo dominio de fibronectina tipo III), lipocalinas, así como gamma-cristalina y otros soportes de Affilin™ (Scil Proteins). Los ejemplos de otros enfoques incluyen "Microcuerpos" sintéticos basados en ciclótidos: proteínas pequeñas que tienen enlaces disulfuro intramoleculares, Microproteínas (Versabodies™, Amunix) y proteínas de repetición de anquirina (DARPs, Molecular Partners).

[Además de las secuencias de anticuerpos y/o un sitio de unión al antígeno, un agente de unión de acuerdo con la presente divulgación puede comprender a otros aminoácidos, por ejemplo, formando un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para impartir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad de unirse al antígeno. Los agentes de unión de la presente divulgación pueden llevar un marcador detectable, o se pueden conjugar con una toxina o un grupo o enzima diana (por ejemplo, a través de un enlace peptídico o un enlazador). Por ejemplo, un agente de unión puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático) así como un sitio de unión al antígeno, en el que el sitio de unión al antígeno se une al antígeno y, por lo tanto, dirige el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo, por escisión.

40 Combinaciones

El tratamiento antitumoral definido en la presente puede aplicarse como una terapia única o puede implicar, además de los compuestos de la presente divulgación, cirugía convencional o radioterapia o quimioterapia. Dicha quimioterapia puede incluir una o más de las siguientes categorías de agentes antitumorales:

(i) otros fármacos antiproliferativos/antineoplásicos y combinaciones de los mismos, como se utilizan en oncología médica, como agentes alquilantes (por ejemplo, cis-platino, oxaliplatino, carboplatino, ciclofosfamida, nitrógeno mostaza, melfalan, clorambucil, busulfan, temozolamida, y nitrosoureas); antimetabolitos (por ejemplo, gemcitabina y antifolatos como fluoropirimidinas como 5-fluorouracilo y tegafur, raltitrexed, metotrexato, arabinosido de citosina e hidroxiaurea); antibióticos antitumorales (por ejemplo, antraciclinas como adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina-C, dactinomicina y mitramicina); agentes antimetabólicos (por ejemplo, alcaloides de la vinca como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina y taxoides como el taxol y taxotere y los inhibidores de polocinasa); e inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, epipodofilotoxinas como etopósido y tenipósido, amsacrina, topotecán y camptotecina);

(ii) agentes citostáticos, como los antioestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, fulvestrant, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno y yodoxifeno), antiandrógenos (por ejemplo, bicalutamida, flutamida, milutamida y acetato de ciproterona) antagonistas de LHRH o agonistas de LHRH (por ejemplo, goserelina, leuprorelina y buserelina), progestágenos (por ejemplo, acetato de megestrol), inhibidores de la aromatasa (por ejemplo, como anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano) e inhibidores de la 5 α -reductasa, como la finasterida;

(iii) Agentes anti-invasión (por ejemplo, inhibidores de la familia c-Src quinasas como 4-(6-cloro-2,3-metilendioxi-anilino)-7-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etoxi]-5-tetrahidropiran-4-iloxiquinazolina (AZD0530; solicitud de patente internacional WO 01/94341) y N-(2-cloro-6-metilfenil)-2-16-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidina-4-

ilamino)tiazol-5-carboxamida (dasatinib, BMS-354825; J. Med. Chem., 2004, 47, 6658-6661), e inhibidores de la metaloproteasa como marimastat, inhibidores de la función del receptor activador del urmininasa plasminógeno o anticuerpos contra heparanasa);

(iv) inhibidores de la función del factor de crecimiento: por ejemplo, dichos inhibidores incluyen anticuerpos del factor de crecimiento y anticuerpos del receptor del factor de crecimiento (por ejemplo, el anticuerpo anti-erbB2 trastuzumab [Herceptin™], el anticuerpo anti-EGFR pan-itumumab, el inhibidor anti-EGFR Bevacizumab (Avastin™), el anticuerpo anti-erbB1 cetuximab [Erbix, C225] y cualquier anticuerpo contra el factor de crecimiento o receptor del factor de crecimiento descrito por Stern et al., Critical reviews in oncology/hasemology, 2005, Vol. 54, pp 11-29); dichos inhibidores también incluyen inhibidores de la tirosina quinasa, por ejemplo, inhibidores de la familia del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, inhibidores de la tirosina cinasa de la familia EGFR, tales como N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (gefitinib, ZD1839), N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina (erlotinib, OSI-774) y 6-acrilamido-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (CI 1033), erbB2 inhibidores de la tirosina cinasa como lapatinib, inhibidores de la familia del factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores del factor de crecimiento derivado de las plaquetas familia como imatinib, inhibidores de serina/treonina quinasa (por ejemplo, inhibidores de señalización de Ras/Raf, como inhibidores de la farnesil transferasa, por ejemplo sorafenib (BAY 43-9006)), inhibidores de la señalización celular a través de MEK y/o AKT cinasa, inhibidores de la familia del factor de crecimiento de hepatocitos, inhibidores de c-kit, inhibidores de la quinasa abl, receptor de IGF (factor de crecimiento similar a la insulina) inhibidores de la cinasa; inhibidores de la aurora quinasa (por ejemplo, AZD1152, PH739358, VX-680, MLN8054, R763, MP235, MP529, VX-528 y AX39459) e inhibidores de la cinasa dependientes de ciclina tales como inhibidores de CDK2 y/o CDK4;

(v) agentes antiangiogénicos, como los que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular, [por ejemplo, el anticuerpo contra el factor de crecimiento de células endoteliales vasculares bevacizumab (Avastin™) y los inhibidores de tirosina quinasa del receptor de VEGF, como el 4-(4-bromo-2-fluoroanilino)-6-metoxi-7-(1-metilpiperidin-4-ilmetoxi)quinazolina (ZD6474; Ejemplo 2 en WO 01/32651), 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-iloxi)-6-metoxi-7-(3-pirrolidin-1-ilpropoxi)quinazolina (AZD2171; Ejemplo 240 en el documento WO 00/47212), vatalanib (PTK787; WO 98/35985) y SU11248 (sunitinib; WO 01/60814), compuestos tales como los descritos en las solicitudes de patente internacional WO97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 y WO 98/13354 y compuestos que funcionan por otros mecanismos (por ejemplo, linomida, inhibidores de la función de la integrina $\alpha\beta3$ y angiostatina);

(vi) agentes dañinos vasculares tales como Combretastatin A4 y compuestos descritos en las Solicitudes de Patentes Internacionales WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 y WO 02/08213;

(vii) terapias antisentido, por ejemplo, las que se dirigen a las dianas enumeradas anteriormente, como ISIS 2503, un antisentido anti-ras;

(viii) enfoques de terapia génica, incluyendo, por ejemplo, enfoques para reemplazar a los genes aberrantes como p53 aberrantes o BRCA1 o BRCA2 aberrantes, GDEPT (terapia de pro-fármacos con enzimas dirigidas por genes) como los que utilizan citosina desaminasa, timidina cinasa o una enzima nitrorreductasa bacteriana y enfoques para aumentar la tolerancia del paciente a la quimioterapia o a la radioterapia, como la terapia génica de resistencia a múltiples fármacos; y

(ix) enfoques de inmunoterapia, que incluyen, por ejemplo, los enfoques *ex vivo* e *in vivo* para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales del paciente, como la transfección con citocinas como la interleucina 2, la interleucina 4 o el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, se aproxima a disminuir la anergia de las células T, los enfoques que se utilizan células inmunitarias transfectadas, como las células dendríticas transfectadas con citocinas, los enfoques que utilizan líneas celulares tumorales transfectadas con citocinas y los enfoques que utilizan anticuerpos anti-idiotípicos.

Tal tratamiento conjunto se puede lograr mediante la dosificación simultánea, secuencial o separada de los componentes individuales del tratamiento. Dichos productos de combinación emplean los compuestos de la presente divulgación, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, dentro del intervalo de dosificación descrito en la presente y el otro agente farmacéuticamente activo dentro de su intervalo de dosificación aprobado.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados obtenidos, se proporcionan solo con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de las enseñanzas de la presente.

Ejemplo 1

Imunización y titulación

Imunización

Las inmunizaciones se realizaron utilizando $\alpha\beta6$ soluble y $\alpha\beta6$ unido a células (transfectantes de CHO que expresan $\alpha\beta6$ humano en la superficie celular), respectivamente. Para la generación de transfectantes de CHO, se insertó

ADNc $\alpha\text{V}\beta 6$ de longitud completa humana en el vector de expresión pcDNA 3. Las células CHO se transfectaron transitoriamente mediante electroporación. La expresión de $\alpha\text{V}\beta 6$ humano en la superficie celular al nivel adecuado para el propósito del inmunógeno se confirmó mediante análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Se utilizaron diez $\mu\text{g}/\text{ratón}$ de proteína soluble para Campaign 1, y 3×10^6 células/ratón de células CHO transfectadas para Campaign 2, para la inmunización inicial en XenoMouse™ de acuerdo con los métodos descritos en la Solicitud de Patente de EE. UU. No. 08/759,620, presentada el 3 de diciembre de 1996 y las solicitudes de patente internacional No. WO 98/24893, publicada el 11 de junio de 1998 y WO 00/76310, publicada el 21 de diciembre del 2000. Después de la inmunización inicial, se administraron trece inmunizaciones de refuerzo posteriores de cinco $\mu\text{g}/\text{ratón}$ para los grupos uno y dos (antígeno soluble) y nueve inmunizaciones de refuerzo posteriores de $1,5 \times 10^6$ células/ratón se administraron para los grupos tres y cuatro (antígeno unido a la célula). Los programas de inmunización se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Sumario de programas de inmunización

Campaña	Grupo	Inmunógeno	Cepa	No. de ratones	Rutas de inmunización
1	1	$\alpha\text{V}\beta 6$ soluble	XMG2/k	10	IP, cola, BIP, 2x/semana durante 6 semanas
1	2	$\alpha\text{V}\beta 6$ soluble	XMG1/kl	10	IP, cola, BIP, 2x/semana durante 6 semanas
2	3	$\alpha\text{V}\beta 6$ unido a células (transfectantes de CHO)	XMG2/k	10	IP, cola, BIP, 2x/semana durante 6 semanas
2	4	$\alpha\text{V}\beta 6$ unido a células (transfectantes de CHO)	XMG1/kl	10	IP, cola, BIP, 2x/semana durante 6 semanas

Selección de Animales para la Cosecha por Titulación

La titulación del anticuerpo contra $\alpha\text{V}\beta 6$ humano se analizaron mediante un ensayo ELISA para ratones inmunizados con antígeno soluble. La titulación del anticuerpo para ratones inmunizados con antígeno nativo (unido a células) se analizaron mediante FACS. Los análisis de ELISA y FACS mostraron que había algunos ratones que parecían ser específicos para $\alpha\text{V}\beta 6$. Por lo tanto, al final del programa de inmunización, se seleccionaron veinte ratones para la cosecha, y se aislaron linfocitos de los bazo y los ganglios linfáticos de los ratones inmunizados, como se describe en el Ejemplo 2.

Ejemplo 2

Recuperación de linfocitos y aislamiento de células B

Los ratones inmunizados se sacrificaron por dislocación cervical, y los ganglios linfáticos de drenaje se recogieron y se agruparon de cada cohorte. Las células linfoides se disociaron mediante molienda en DMEM para liberar a las células de los tejidos y las células se suspendieron en DMEM. Las células B se enriquecieron mediante selección negativa en IgM y selección positiva en IgG. Las células se cultivaron para permitir la expansión y diferenciación de las células B en células plasmáticas secretoras de anticuerpos.

Las células plasmáticas secretoras de anticuerpos se cultivaron como de rutina en el medio selectivo. Los sobrenadantes exhaustivos recolectados de las células que potencialmente producen anticuerpos anti- $\alpha\text{V}\beta 6$ humanos se sometieron a ensayos de selección posteriores como se detalla en los ejemplos a continuación.

Ejemplo 3

Unión a $\alpha\text{V}\beta 6$ unido a células

Se evaluó la unión de anticuerpos secretados a $\alpha\text{V}\beta 6$. La unión a $\alpha\text{V}\beta 6$ unido a la célula se evaluó utilizando un escáner macroconfocal FMAT, y la unión a $\alpha\text{V}\beta 6$ soluble se analizó mediante ELISA, como se describe a continuación.

Los sobrenadantes recolectados de células cosechadas se analizaron para evaluar la unión de anticuerpos secretados a células HEK 293 que sobreexpresan establemente a $\alpha\text{V}\beta 6$. Se utilizó una línea celular parental 293F como control negativo. Las células en medio Freestyle (Invitrogen) se sembraron en placas FMAT de 384 pocillos en un volumen de 50 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ a una densidad de 2500 células/pocillo para los transfectantes estables, y a una densidad de 22,500

5 células/pocillo para las células parentales, y las células se incubaron durante la noche a 37°C. Posteriormente, se agregaron 10 µl/pocillo de sobrenadante y las placas se incubaron durante aproximadamente una hora a 4°C, después de lo cual se agregaron 10 µl/pocillo de anticuerpo secundario anti-IgG-Cy5 a una concentración de 2.8 µg/ml (concentración final 400 ng/ml). Las placas se incubaron luego durante una hora a 4°C y se leyó la fluorescencia utilizando un escáner macroconfocal FMAT (Applied Biosystems). Los resultados de FMAT para 11 anticuerpos se resumen en la Tabla 3.

10 Adicionalmente, la unión del anticuerpo a αVβ6 soluble se analizó mediante ELISA. Las placas de 96 pocillos de unión al medio Costar (catálogo Costar #3368) se recubrieron incubando durante la noche a 4°C con αVβ6 a una concentración de 5 µg/ml en tampón TBS/MgCl₂ 1 mM para un volumen total de 50 µl/pocillo. Las placas se lavaron con TBS/1 mM de tampón MgCl₂ y se bloquearon con 250 µl de IX PBS/1% de leche durante treinta minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron diez µl de sobrenadante a 40 µl de TBS/1 mM MgCl₂/1% de leche y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y posteriormente se incubaron con IgG Fc-peroxidasa antihumana de cabra a 0.400 ng/ml en TBS/1 mM MgCl₂/1% de leche, y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y luego se revelaron con sustrato TMB de 1 paso. Los resultados de ELISA para uno de los anticuerpos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Unión de sobrenadantes a αVβ6 soluble y αVβ6 unido a células

mAb	Datos FMAT			Datos ELISA
	Conteo	FL1	Conteo FL1X	DO
sc 049	185	4377.73	809880	ND
sc 058	ND	ND	ND	1.79
sc 188	127	628.04	79761	ND
sc 097	98	1237.18	121243	ND
sc 277	28	382.31	10704	ND
sc 133	82	709.82	58205	ND
sc 161	23	725.21	16679	ND
sc 254	174	9179.65	1597259	ND
sc 264	63	734.29	46260	ND
sc 298	102	2137.94	218069	ND
sc 374	174	4549.65	791639	ND
sc 320	141	3014.63	425062	ND
Control negativo (blanco)	0	0	0	0.21
Control positivo (2077z-1µg/ml)	67	659.49	44185	6.00

Ejemplo 4

Inhibición de la Adhesión Celular

20 Con la finalidad de determinar la potencia relativa de los diferentes sobrenadantes que contienen anticuerpos, se evaluó la capacidad de los anticuerpos para inhibir la adhesión mediada por TGFβLAP de células HT29 positivas para αVβ6. Las placas se recubrieron durante la noche con 10 µg/ml de TGFβLAP y se pre-bloquearon con BSA/PBS al 3% durante 1 hora antes del ensayo. Las células se sedimentaron y se lavaron dos veces en HBBS, después de lo cual las células se resuspendieron en HBSS a las concentraciones apropiadas. Las células se incubaron en presencia de anticuerpos apropiados a 4°C durante 30 minutos en una placa con fondo en forma de V. La solución de recubrimiento de antígeno se eliminó y las placas se bloquearon con 100 µl de BSA al 3% durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron dos veces con PBS o HBSS, y las mezclas de anticuerpos celulares se transfirieron a la placa recubierta y la placa se incubó a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente las células de las placas recubiertas se lavaron cuatro veces en HBSS caliente y, a continuación, las células se congelaron a -80°C

5 durante una hora. Las células se dejaron descongelar a temperatura ambiente durante una hora, y luego se agregaron a cada pozo 100 µl de tampón de colorante/lisis CyQuant (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se leyó a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. Los resultados para doce anticuerpos se resumen en la Tabla 4. Los anticuerpos que se muestran tuvieron una variación en potencia desde un 62% de inhibición hasta más del 100% de inhibición, en relación con los pocillos de control recubiertos y no recubiertos en la placa que se utilizaron para representar los valores de adhesión máximos y mínimos que se podrían obtener en el ensayo.

Tabla 4. Ensayo de Adhesión

ID del anticuerpo	Ensayo de inhibición 1%	Ensayo de inhibición 2%	Inhibición promedio %
sc 049	80%	98%	89%
sc 058	77%	46%	62%
sc 097	96%	106%	101%
sc 133	99%	106%	103%
sc 161	98%	106%	102%
sc 188	99%	103%	101%
sc 254	98%	106%	102%
sc 264	98%	100%	99%
sc 277	98%	101%	100%
sc 298	98%	102%	100%
sc 320	97%	97%	97%
sc 374	118%	89%	104%

10 **Ejemplo 5**

Reactividad Cruzada de αVβ6 de Macaco y αV de Humano

La reactividad cruzada de los sobrenadantes que contenían anticuerpos para αVβ6 de macaco se probó en los sobrenadantes utilizando análisis FACS en células HEK-293 transfectadas transitoriamente con αV de mono cangrejero y β6 de mono cangrejero.

15 También se probó la reactividad cruzada para αV humana. Para este ensayo, se probó la reactividad cruzada en los sobrenadantes utilizando el análisis FACS en células A375M parentales, que expresan αVβ3 y αVβ5, pero no αVβ6. Esta pantalla se diseñó para mostrar que los anticuerpos reconocían específicamente la cadena β6 o la cadena β6 en combinación con αV. El ensayo αV humano se realizó al mismo tiempo que el cribado de reactividad cruzada αVβ6.

20 Los ensayos se realizaron de la siguiente manera. Las células A375M que tenían una confluencia de aproximadamente el 75% se marcaron con colorante intracelular CFSE mediante disociación y luego la sedimentación de las células (equivalente a 250,000 a 300,000 células por pocillo) en un tubo de falcon, luego se resuspendieron en 0.125 µM de CFSE en un tampón FACS hasta un volumen final de 100 µl por cada 250,000 células, y luego incubando a 37°C durante cinco minutos. Las células se sedimentaron, el sobrenadante se descartó y se resuspendió en tampón FACS y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Las células se lavaron dos veces con tampón FACS y se resuspendieron en un volumen final de 100 µl de tampón FACS por pocillo.

25 Las células HEK-293 se transfectaron de forma transitoria con αV de mono cangrejero y β6 de mono cangrejero. Después de 48 horas, las células se recogieron y se resuspendieron en tampón FACS para alcanzar una concentración final de aproximadamente 50,000 células en 100 µl.

30 Se usaron aproximadamente 100,000 células en total, que comprenden una mezcla 50:50 de células A375M marcadas con CFSE y 293 células transfectadas, en cada reacción como se menciona a continuación. Se administraron 100 µl de células A375M marcadas con CFSE y 100 µl de células 293 en una placa con fondo en V. Las células en la placa se sedimentaron a 1500 rpm durante 3 minutos y posteriormente se resuspendieron en 100 µl de tampón FACS. Se repitió la etapa de sedimentación y se eliminó el sobrenadante de tampón FACS. Los sobrenadantes que contenían anticuerpos cosechados, o los anticuerpos primarios de control, se añadieron en un volumen de 50 µl y las células se

resuspendieron. Los controles primarios de anticuerpos fueron $\alpha\beta6$ murinos (Cat#MAB2077z, Chemicon) y un anti- αV ecombinante. La placa se incubó en hielo durante 45 minutos, después de lo cual se agregaron 100 μ l de tampón FACS para diluir a el anticuerpo primario. Las células se sedimentaron a continuación mediante centrifugación a 1500 rpm durante 3 minutos, y el sedimento se resuspendió en 100 μ l de tampón FACS. Se repitió la etapa de sedimentación y se eliminó el sobrenadante de tampón FACS. Las células se resuspendieron luego en el anticuerpo secundario apropiado (5 μ g/ml) con colorante 7AAD (10 μ g /ml) y se tiñeron en hielo durante 7 minutos. Posteriormente se agregaron 150 μ l de tampón FACS y las células se sedimentaron a 1500 rpm durante 3 minutos, después de lo cual las células se lavaron en 100 μ l de tampón FACS, se sedimentaron y luego se resuspendieron en 250 μ l de tampón y se agregaron a los tubos FACS. Las muestras se analizaron en una máquina FACS de alto rendimiento y se analizaron utilizando el software Cell Quest Pro.

Los resultados para doce anticuerpos se resumen en la Tabla 5, y demuestran que los anticuerpos mostrados fueron capaces de unirse específicamente a $\alpha\beta6$ de macaco pero no fueron capaces de unirse de manera específica a αV humana en las células A375M parentales.

Tabla 5. Reactividad Cruzada de $\alpha\beta6$ de Macaco y αV de Humano

ID de anticuerpo	Mac AVB6 % Células desplazadas	Mac AVB6 GeoMedia	A375M % Células desplazadas	A375M GeoMedia
sc 049	23%	30.19	20%	1.74
sc 058	25%	22.77	18%	1.78
sc 097	35%	37.04	24%	1.84
sc 133	32%	35.22	24%	1.79
sc 161	14%	32.98	11%	16.68
sc 188	18%	23.9	13%	1.65
sc 254	59%	78.49	55%	2.31
sc 264	55%	66.38	46%	2.35
sc 277	35%	33.35	23%	1.86
sc 298	53%	63.08	45%	2.14
sc 320	19%	33.45	15%	23.18
sc 374	51%	61.79	39%	2.14
Control Isotipo IgG Humano	1% (día 1) 0% (día 2)	9.54 (día 1) 7.39 (día 2)	5% (día 1) 1% (día 2)	1.66 (día 1) 7.23 (día 2)
IgG2 de ratón con anticuerpo secundario murino	1% (día 1) 0% (día 2)	8.85 (día 1) 11.21 (día 2)	4% (día 1) 3% (día 2)	1.67 (día 1) 11.16 (día 2)
Control positivo 2077z	42% (día 1) 11% (día 2)	55.52 (día 1) 28.11 (día 2)	30% (día 1) 5% (día 2)	2.03 (día 1) 15.36 (día 2)

Ejemplo 6

Ensayo de Placas Hemolíticas Específicas para $\alpha\beta6$

Se seleccionaron células plasmáticas secretoras de anticuerpos de cada cosecha para la producción de anticuerpos recombinantes. Aquí, se utilizó un ensayo de placa fluorescente para identificar a las células plasmáticas individuales que expresan anticuerpos contra $\alpha\beta6$. Posteriormente, las células individuales se sometieron a la transcripción reversa y a la reacción en cadena de la polimerasa para rescatar y amplificar las cadenas ligeras pesadas y variables que codifican para la especificidad del anticuerpo inicial, como se describe en el Ejemplo 7. La preparación de una serie de reactivos y materiales especializados necesarios para realizar el ensayo de placa hemolítica específica para $\alpha\beta6$ se describe a continuación.

5 *Biotinilación de glóbulos rojos de oveja (BGRO).* Los BGRO se almacenaron en medios RPMI como un stock al 25%. Se obtuvo un gránulo de células empaquetadas BGRO de 250 µl mediante la alícuota de 1.0 ml del stock en un tubo falcon de 15 ml, centrifugando las células y eliminando el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió luego en 4.75 ml de PBS a pH 8.6 en un tubo de 50 ml. En un tubo separado de 50 ml, se añadieron 2,5 mg de biotina Sulfo-NHS a 45 ml de PBS a pH 8.6. Una vez que la biotina se disolvió por completo, se agregaron 5 ml de BGRO y el tubo se rotó a temperatura ambiente durante 1 hora. Los BGRO se centrifugaron a 3000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se retiró y se añadieron 25 ml de PBS a pH 7.4 a forma de lavado. El ciclo de lavado se repitió 3 veces, posteriormente se agregaron 4.75 ml de medio de células inmunitarias (RPMI 1640 con 10% de FCS) al pellet de 250 µl de BGRO biotinilado (B- BGRO) para resuspender suavemente a el B-BGRO (5% B-BGRO stock). El stock se almacenó a 4°C hasta que fue necesario.

10 *Recubrimiento de estreptavidina (SA) de B- BGRO.* Se transfirió un ml del stock de B- BGRO al 5% a un tubo eppendorf nuevo. Las células B-BGRO se sedimentaron con un giro de pulso a 8000 rpm (6800 rcf) en una microcentrífuga. Posteriormente se retiró el sobrenadante, se volvió a suspender el sedimento en 1.0 ml de PBS a pH 7.4 y se repitió la centrifugación. El ciclo de lavado se repitió 2 veces, posteriormente el sedimento de B-BGRO se resuspendió en 1,0 ml de PBS a pH 7.4 para obtener una concentración final al 5% (v/v). Se añadieron 10 µl de una solución stock de 10 mg/ml de estreptavidina (CalBiochem, San Diego, CA). El tubo se mezcló y se hizo girar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se repitieron los pasos de lavado y se volvió a suspender el SA-BGRO en 1 ml de PBS pH 7.4 (5% (v/v)).

15 *Recubrimiento αVβ6 humano de SA- BGRO.* Se utilizó antígeno soluble (que carece del dominio transmembrana) para recubrir el BGRO. Se utilizaron ambas cadenas porque αVβ6 solo se presenta en la superficie celular como un dímero. Los SA-BGRO se recubrieron con el αVβ6 biotinilado a 50 µg/ml, se mezclaron y se giraron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Los BGRO se lavaron dos veces con 1.0 ml de PBS a pH 7.4 como anteriormente. Los BGRO recubiertos con Ag se resuspendieron en RPMI (+10% FCS) hasta una concentración final del 5% (v/v).

20 *Determinación de la calidad de αVβ6-BGRO mediante inmunofluorescencia (IF).* Se agregaron 10 µl de SA-BGRO al 5% y 10 µl de BGRO recubierto con Ag al 5% en un tubo eppendorf de 1.5 ml recién preparado que contiene 40 µl de PBS. Se añadieron anticuerpos anti-αVβ6 humanos a cada muestra de BGRO a 50 µg/ml. Los tubos se rotaron a temperatura ambiente durante 25 min, y luego las células se lavaron tres veces con 100 µl de PBS. Las células se resuspendieron en 50 µl de PBS y se incubaron con 2 µg/ml de anticuerpo anti-Gt IgG humana Fc conjugado con el colorante fluorescente fotoestable Alexa488 (Molecular Probes, Eugene, OR). Los tubos se rotaron a temperatura ambiente durante 25 minutos, seguido de lavados con 100 µl de PBS y se resuspensión en 10 µl de PBS. Se mancharon 10 µl de las células teñidas en un portaobjetos de microscopio de vidrio limpio, se cubrieron con un cubreobjetos de vidrio, se observaron bajo luz fluorescente y se puntuaron en una escala arbitraria de 0-4 para evaluar la calidad de las células aisladas.

25 *Preparación de células plasmáticas.* Se cosecharon los contenidos de un solo cultivo de células B identificado previamente como neutralizante para la actividad de αVβ6 (que por lo tanto contiene un clon de células B que secreta la inmunoglobulina de interés). El cultivo de células B presente en el pozo se recuperó mediante la adición de RPMI +FCS al 10% a 37°C. Las células se resuspendieron mediante pipeteo y luego se transfirieron a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml (volumen final aproximado de 500-700 µl). Las células se centrifugaron en una microcentrífuga a 1500 rpm (240 rcf) durante 2 minutos a temperatura ambiente, posteriormente el tubo se giró 180 grados y se centrifugó nuevamente durante 2 minutos a 1500 rpm. Los medios congelados se retiraron y las células inmunitarias se resuspendieron en 100 µl de RPMI (10% de FCS) y luego se centrifugaron. Este lavado con RPMI (10% de FCS) se repitió y las células se resuspendieron en 60 µl de RPMI (FCS) y se almacenaron en hielo hasta que estuvieron listas para utilizarse.

30 *Rendimiento del ensayo de placa hemolítica.* A la muestra de 60 µl de células inmunes se le agregaron 60 µl de cada uno de los BGRO recubiertos de αVβ6 (stock 5% v/v), 4x de complemento de conejillo de indias (Sigma, Oakville, ON) preparado en RPMI (FCS), y 4x sueros potenciadores en stock (1: 900 en RPMI (FCS)). La mezcla (3-5 µl) se colocó sobre tapas plásticas de placas de cultivo de tejido Falcon de 100 mm y las manchas se cubrieron con aceite de parafina no diluido. Los portaobjetos se incubaron a 37°C durante un mínimo de 45 minutos.

35 *Análisis de los resultados del ensayo en placa.* El recubrimiento de los glóbulos rojos de oveja con el dominio catalítico de αVβ6 humano fue exitoso. Estos glóbulos rojos recubiertos con Ag se utilizaron posteriormente para identificar células plasmáticas específicas de antígeno de los pocillos que se muestran a continuación en la Tabla 6. Estas células se aislaron posteriormente por micromanipulación. Después de la micromanipulación para poder rescatar las células plasmáticas específicas del antígeno, los genes que codifican para los genes de la región variable se rescataron mediante RT-PCR en una sola célula plasmática, como se describe más adelante en el Ejemplo 7.

55 Tabla 6. Resultados de la Placa de Ensayo

ID Placa Parental		Placa de Ensayo		
Placa	Fila	Columna	Ensayo	Células individuales

ID Placa Parental			Placa de Ensayo	
68	B	10	Fluorescente	45-57
296	D	10	Fluorescente	58-59
318	F	1	Hemolítico	60-62
612	G	1	Fluorescente	187-189
752	D	12	Fluorescente	95-100
762	D	8	Fluorescente	277-286
766	B	5	Fluorescente	132-143, 147-150
827	E	12	Fluorescente	159-170
659	F	11	Fluorescente	252-263
761	H	3	Fluorescente	264-276
765	A	8	Fluorescente	287-298
652	D	2	Fluorescente	374-379, 392-397
806	A	6	Fluorescente	312-321

Ejemplo 7

Aislamiento de proteínas recombinante

5 Después del aislamiento de las células plasmáticas individuales deseadas del Ejemplo 4, se extrajo el ARNm y se realizó una PCR con transcriptasa inversa para generar un ADNc que codifica para las cadenas pesada y ligera variables del anticuerpo secretado por cada célula. El ADNc de cadena pesada variable humana se digirió con enzimas de restricción que se agregaron durante la PCR y los productos de esta reacción se clonaron en un vector de expresión IgG2 con voladizos compatibles para la clonación. Este vector se generó clonando el dominio constante de IgG2 humana en el sitio de clonación múltiple de pcDNA3.1+/ Hygro (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canadá). El ADNc de cadena ligera variable humana se digirió con enzimas de restricción que se agregaron durante la reacción de PCR y los productos de esta reacción se clonaron en un vector de expresión IgKappa o IgLamda con salientes compatibles para la clonación. Este vector se generó clonando el dominio constante de IgK o IgL humana en el sitio de clonación múltiple de pcDNA3.1+/Neo (Invitrogen).

15 Los vectores de expresión de la cadena pesada y de la cadena ligera se cotransfectaron utilizando lipofectamina en una placa de 60 mm de células confluentes (HEK) 293 al 70% de riñón embrionario humano. Las células transfectadas secretaron un anticuerpo recombinante con la especificidad idéntica a la célula plasmática original durante 24 a 72 horas. El sobrenadante (3 ml) se cosechó de las células HEK 293 y se demostró la secreción de un anticuerpo intacto con un ELISA tipo sándwich para detectar específicamente a la IgG humana. La especificidad se confirmó mediante la unión del anticuerpo recombinante a $\alpha\beta6$ mediante ELISA. Los clones rescatados que secretan anticuerpos que podrían unirse al antígeno diana se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Datos de Secreción y Unión Para Los Anticuerpos Recombinantes

ID Placa Parental			
Placa	Fila	Columna	ID de Anticuerpo
68	B	10	49
296	D	10	58
612	G	1	188
752	D	12	97
762	D	8	277

ID Placa Parental			
766	B	5	133
827	E	12	161
659	F	11	254
761	H	3	264
765	A	8	298
652	D	2	374
806	A	6	320

Ejemplo 8

Purificación de Anticuerpos Recombinantes

5 Para la producción a gran escala de los anticuerpos anti- α V β 6, los vectores de expresión de cadena pesada y ligera (2.5 μ g de cada cadena/placa) se sometieron a lipofección en diez placas de 100 mm que eran 70% confluentes con células HEK 293. Las células transfectadas se incubaron a 37°C durante 4 días, el sobrenadante (6 ml) se cosechó y se reemplazó con 6 ml de medio fresco. En el día 7, se eliminó el sobrenadante y se juntó con la cosecha inicial (120 ml en total de 10 placas). Los anticuerpos se purificaron a partir del sobrenadante utilizando una cromatografía de afinidad de la Proteína-A Sefarosa (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) (1 ml). Los anticuerpos se eluyeron de la columna de Proteína A con 500 μ l de glicina 0.1 M, pH 2.5. El eluato se dializó en PBS a pH 7.4 y se esterilizó por filtración. Los anticuerpos se analizaron mediante SDS-PAGE no reductor para evaluar la pureza y el rendimiento. La concentración de proteína se determinó determinando la densidad óptica a 280 nm.

Ejemplo 9

Análisis Estructural de Anticuerpos de α V β 6

15 Las cadenas pesadas variables y las cadenas ligeras variables de los anticuerpos se secuenciaron para determinar sus secuencias de ADN. La información de las secuencias completas para los anticuerpos anti- α V β 6 se proporciona en la lista de secuencias con secuencias de nucleótidos y aminoácidos para cada la combinación de la cadena gamma y kappa/lambda. Las secuencias pesadas variables se analizaron para determinar a la familia VH, la secuencia de la región D y la secuencia de la región J. Las secuencias luego se tradujeron para determinar la secuencia de aminoácidos primaria y se compararon con las secuencias de la línea germinal VH, D y J para evaluar las hipermutaciones somáticas.

25 La Tabla 8 es una tabla que compara las regiones de la cadena pesada del anticuerpo con su región de la cadena pesada de la línea germinal correspondiente. La Tabla 9 es una tabla que compara las regiones de la cadena ligera kappa o lambda del anticuerpo con la región de la cadena ligera de la línea germinal correspondiente. Las regiones variables (V) de las cadenas de inmunoglobulina están codificadas por múltiples segmentos de ADN de línea germinal, que se unen en regiones variables funcionales ($V_H D J_H$ o $V_K J_K$) durante la ontogenia de las células B. La diversidad molecular y genética de la respuesta del anticuerpo a α V β 6 se estudió en detalle. Estos ensayos revelaron varios puntos específicos de los anticuerpos anti- α V β 6.

30 De acuerdo con los datos de secuenciación, la estructura primaria de las cadenas pesadas de sc 298 y sc 374 son similares, pero no idénticas. sc 254 es estructuralmente diferente de los otros dos. También debería apreciarse que cuando un anticuerpo particular difiere de su secuencia de línea germinal respectiva a nivel de aminoácidos, la secuencia del anticuerpo puede mutarse de nuevo a la secuencia de línea germinal. Dichas mutaciones correctivas pueden ocurrir en una, dos, tres o más posiciones, o una combinación de cualquiera de las posiciones mutadas, utilizando técnicas estándar de biología molecular. A modo de ejemplo no limitativo, la Tabla 9 muestra que la secuencia de la cadena ligera de sc 298 (SEQ ID NO: 40) difiere de la secuencia de la línea germinal correspondiente (SEQ ID NO: 68) por una mutación de Val a Ala (mutación 1) en la región FR1, a través de una mutación Leu a Ala (mutación 2) en la región RCD1 y de Asn a Ser en la región FR3. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos o nucleótidos que codifica la cadena ligera de sc 298 puede modificarse para cambiar la mutación 1 para producir la secuencia de la línea germinal en el sitio de la mutación 1. Además, la secuencia de aminoácidos o nucleótidos que codifica la cadena ligera de mAb sc 298 puede modificarse para cambiar la mutación 2 para producir la secuencia de la línea germinal en el sitio de la mutación 2. Además, la secuencia de aminoácidos o nucleótidos que para codifica la cadena ligera del mAb sc 298 puede modificarse para cambiar la mutación 3 para producir la secuencia de la línea germinal en el sitio de la mutación 3. Aún más, la secuencia de aminoácidos o nucleótidos que codifica la cadena ligera de sc 298 puede modificarse para cambiar la mutación 1, la mutación 2 y la mutación 3 para obtener la secuencia

de la línea germinal en los sitios de las mutaciones 1, 2 y 3. Aún más, la secuencia de aminoácidos o nucleótidos que codifica para la cadena ligera de sc 298 puede modificarse para cambiar cualquier combinación de mutación 1, mutación 2 y mutación 3. En otro ejemplo, cadena pesada de sc 264 (SEQ ID NO: 30) difiere de su línea germinal (SEQ ID NO: 55) en la posición 61. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos o nucleótidos que codifica para la cadena pesada de sc 264 puede modificarse de una N a Y para obtener la secuencia de la línea germinal. Las tablas 10-13 a continuación ilustran la posición de tales variaciones desde la línea germinal para sc 133, sc 188 y sc 264. Cada fila representa una combinación única de residuos de línea germinal y no germinal en la posición indicada con negritas. Los ejemplos particulares de una secuencia de anticuerpo que puede ser mutada de nuevo a la secuencia de la línea germinal incluyen: sc 133 donde la L en el aminoácido 70 de la cadena pesada se muta de nuevo al aminoácido de la línea germinal de M (referido en la presente memoria como sc 133 TMT); sc 133 donde el N en el aminoácido 93 de la cadena ligera se muta nuevamente al aminoácido de la línea germinal de D (referido en la presente memoria como sc 133 WDS); y sc 264 donde la A en el aminoácido 84 de la cadena ligera se muta nuevamente al aminoácido de la línea germinal de D (referido en la presente memoria como sc 264 ADY).

En la presente memoria también se describe un método para modificar uno o más de los aminoácidos en las regiones RCD, es decir, RCD1, RCD2 y/o RCD3. En un ejemplo, se modifica la RCD3 de la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente memoria. Típicamente, el aminoácido es sustituido con un aminoácido que tiene una cadena lateral similar (una sustitución de aminoácido conservativo) o puede estar sustituido con cualquier aminoácido apropiado, como una alanina o una leucina. También se describe en la presente memoria donde el sc 264 RCD3, VATGRGDYHFYAMDV (residuos de aminoácidos 100-114 de la SEQ ID NO: 30), puede modificarse en uno o más aminoácidos. Los solicitantes ya han demostrado que la región RCD3 se puede modificar sin afectar adversamente la actividad, es decir, véase sc 264 RAD donde la segunda G en la región RCD3 se sustituye por una A. También se contemplan otras modificaciones dentro de la región RCD3. También se describe en la presente memoria donde la región sc 133 RCD3, RLDV, puede modificarse en uno o más aminoácidos, lo que incluye sustituir una L por una A y/o la V por una A. Los medios para sustituir a los aminoácidos son bien conocidos en la técnica e incluyen mutagénesis sitio dirigida.

En la presente memoria también se describe un método para reemplazar cualquier pasivo estructural en la secuencia que podría afectar a la heterogeneidad o especificidad de unión de los anticuerpos de la presente divulgación. En un ejemplo, el anticuerpo sc 264 tiene una secuencia RGD en la región RCD3 que podría ocasionar un enlace de reactividad cruzada. Por lo tanto, el residuo de glicina en el RGD se puede reemplazar con una alanina (sc 264 RAD).

Tabla 8. Análisis de cadenas pesadas

Nombre de la cadena	No. SEQ ID:	V	D	J	FR1	RDC1	FR2	RDC2	FR3	RDC3	FR4
sc 133	49	Línea germinal	JH6B	JH6B	OVQLVDSGAEVKK PGASVKVSCAS	GYFTG YIMH	WVROAPG QGLEVMG	WVNPSSGGT NYAQKFOG	RVTIMRDTISSTAYME LSRLSRDDTAVYYCAR	RL--	WGQGIT VTVSS
							WVROAPG QGLEVMG	WVNPSSGGT NYAQKFOG	RVTIMRDTISSTAYME LSRLSRDDTAVYYCAR	RLDV	WGQGIT VTVSS
sc 320	42	Línea germinal	JH6B	JH6B	EVQLVESGGGLVK PGGSLRLSCAAS	GFTFSS YSMN	WVROAPG KGLEWWS	SISSSSYI YYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	- VQLERYYY YGMDEV	WGQGIT VTVSS
							WVROAPG KGLEWWS	SISSSSYI YYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	DPVPLERRD YYYGMDEV	WGQGIT VTVSS
sc 58	6	Línea germinal	JH6B	JH6B	EVQLVESGGGLVK PGGSLRLSCAAS	GFTFSS YAMS	WVROAPG KGLEWWS	AISGGSGST YYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	- VDTAMVY MDV	WGQGIT VTVSS
							WVROAPG KGLEWWS	AISGGSGST YYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	GVDTAMVY GMDV	WGQGIT VTVSS
sc 298	38	Línea germinal	JH6B	JH6B	EVQLVESGGGLVK PGGSLRLSCAAS	GFTFSS YGMH	WVROAPG KGLEWA	WVWDGSK YYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	-JAAR-- YYYYYGMDEV	WGQGIT VTVSS
							WVROAPG KGLEWA	WVWDGSK YYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	DLAARRGDY YYYGMDEV	WGQGIT VTVSS
sc 374	46	Línea germinal	JH6B	JH6B	EVQLVESGGGLVK PGGSLRLSCAAS	GFTFSS YGMH	WVROAPG KGLEWA	WVWDGSK YYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	DLAARRGDY YYYGMDEV	WGQGIT VTVSS
							WVROAPG KGLEWA	WVWDGSK YYADSVKG	RFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	DLAARRGDY YYYGMDEV	WGQGIT VTVSS
sc 254	26	Línea germinal	JH6B	JH6B	OVQLQESGPGLVK PSQTLSTCTVS	GGSISS SSYYWS	WVROHPG KGLEWIG	YIYSGSTY YNPFLKS	RVTISVDTSKNOFSLK MNSLRAEDTAVYYCAR	-GIAAAG-- YYYYYGMDEV	WGQGIT VTVSS
							WVROHPG KGLEWIG	YIYSGSTY YNPFLKS	RVTISVDTSKNOFSLK MNSLRAEDTAVYYCAR	YRGPAAARG DFYFYGMDV	WGQGIT VTVSS
sc 49	2	Línea germinal	JH6B	JH6B	OVQLQESGPGLVK PSQTLSTCTVA	GGSISS SSYYWS	WVROHPG KGLEWIG	YIYSGSTY YNPFLKS	RVTISVDTSKNOFSLK MNSLRAEDTAVYYCAR	--ITIFGVFDY	WGQGIT VTVSS
							WVROHPG KGLEWIG	YIYSGSTY YNPFLKS	RVTISVDTSKNOFSLK MNSLRAEDTAVYYCAR	GGATIFGVFD Y	WGQGIT VTVSS

(continuación)

Nombre de la cadena	No. SEQ ID:	V	D	J	FR1	RDC1	FR2	RDC2	FR3	RDC3	FR4
	55	Línea germinal			QVQLVDSGPGLVK PSQITLSLCTVS	GSISSS GGYYWS	WIRQHPG KGLEWIG	YIYSGSTY YNPSLAK	RYITRTDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCAR	VAIL— YYYYGMDV	WGQGIT VTVSS
sc 264	30	VH4-31	D5-12	JH6B	QVQLVDSGPGLVK PSQITLSLCTVS	GSISSS GGYYWS	WIRQHPG KGLEWIG	YIYSGSTY NPSLAK	RYITRTDTSISTAYME LSRLRSDDTAVYYCAR	VATGRGDYH FYAMDV	WGQGIT VTVSS
	56	Línea germinal			QVQLVDSGPGLVK PSQITLSLCTVS	GSISSS GGYYWS	WIRQHPG KGLEWIG	YIYSGSTY YNPSLAK	RFTISRDAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR	— LRYYYYYGMD V	WGQGIT VTVSS
sc 188	22	VH3-21	D1-1	JH6B	QVQLVDSGPGLVK PSQITLSLCTVS	GSISSS GYYWT	WIRQHPG NGLEWIG	YIYSGSTY YNPSLAK	RYTISVDSKQFSLN LTSYTAADTAVYYCAR	EGPLRGDYY YGLDV	WGQGIT VTVSS
	57	Línea germinal			EVQLVDSGAEVKK PQESLKISCKGS	GYSFTS YWG	WRQMPG KGLEWIG	IIPGSDT RYSPFQGG	QVTISADKISISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCAR	SSGYYAFD I	WGQGIT VTVSSA
sc 97	10	VH3-21	D5-5	JH6B	EVQLVDSGAEVKK PQESLKISCKGS	GYSFTS YWG	WRQMPG KGLEWIG	IIPGSDT RYSPFQGG	QVILSADKISISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCAR	HDESSGYYY VFDI	WGQGIT VTVSSA
	58	Línea germinal			EVQLVDSGAEVKK PQESLKISCKGS	GYSFTS YWG	WRQMPG KGLEWIG	IIPGSDT RYSPFQGG	QVILSADKISISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCAR	—GMDV	WGQGIT VTVSS
sc 277	34	VH3-33	D6-6	JH6B	EVQLVDSGAEVKK PQESLKISCKGS	GYSFTS YWG	WRQMPG KGLEWIG	IIPGSDT RYSPFQGG	QVILSADKISISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCAR	HPMEDFMDV	WGQGIT VTVSS
	59	VH3-33	D6-6	JH6B	EVQLVDSGAEVKK PQESLKISCKGS	GYSFTS YWG	WRQMPG KGLEWIG	IIPGSDT RYSPFQGG	QVILSADKISISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCAR	—GIAAAG- YYYYGMDV	WGQGIT VTVSSA
sc 161	18	Línea germinal			EVQLVDSGAEVKK PQESLKISCKGS	GYSFTS YWG	WRQMPG KGLEWIG	IIPGSDT RYSPFQGG	QVILSADKISISTAYLQ WSSLKASDTAMYYCAR	HGIAAAGFY YYYYMDV	WGQGIT VTVSSA

Tabla 9. Análisis de cadenas ligeras

Nombre de la cadena	No. SEQ ID:	V Kappa	J	FR1	RDC1	FR2	RDC2	FR3	RDC3	J
sc 254	60	Línea germinal		DIVMTQPLSLS VTPGPASISC	KSSQSLH SDGKTYLY	WYQKPGQ PPQLLY	EYSN RFS	GYDRFSGSGSDFT LKISRVEADVGCYYC	MQSIQL PWT	FGQGTK VEIK
	28	A2	JK1	DIVMTQPLSLS VTPGPASIFC	KSSQSLN SDGKTYLC	WYQKPGQ PPQLLY	EYSN RFS	GYDRFSGSGSDFT LKISRVEADVGCYYC	MQGIQL PWAF	FGQGTK VEIK
sc 188	61	Línea germinal		EIVLTWSPGTL LPPGERATLSC	RASQSVSS SYLA	WYQKPGQ APRLLY	GASS RAT	GIPDRFSGSGSDFT LTSRLEPEDFAVYYC	QOYGSS PWT	FGQGTK VEIK
	24	A27	JK1	EIVLTWSPGTL LPPGERATLSC	RAGQTISS RYLA	WYQKPGQ APRLLY	GASS RAT	GIPDRFSGSGSDFT LTSRLEPEDFAVYYC	QOYGSS PRT	FGQGTK VEIK
sc 374	48	A27	JK1	EIVLTWSPGTL LPPGERATLSC	RASQSVSS SYLA	WYQKPGQ APRLLY	GASS RAT	DIPDRFSGSGSDFT LTSRLEPEDFAVYYC	QOYGSS PWT	FGQGTK VEIK
	62	Línea germinal		EIVLTWSPGTL LPPGERATLSC	RASQSVSS SYLA	WYQKPGQ APRLLY	GASS RAT	GIPDRFSGSGSDFT LTSRLEPEDFAVYYC	QOYGSS PYT	FGQGTK LEIK
sc 49	4	A27	JK2	EIVLTWSPGTL LPPGERATLSC	RASQSVSS SYLA	WYQKPGQ APRLLY	GASS RAT	GIPDRFSGSGSDFT LTSRLEPEDFAVYYC	QOYGSS PCS	FGQGTK LEIK
	63	Línea germinal		EIVLTWSPGTL LSPGERATLSC	RASQSVSS SYLA	WYQKPGQ APRLLY	GASS RAT	GIPDRFSGSGSDFT LTSRLEPEDFAVYYC	QOYGSS PFT	FGPGTK VDIKR
sc 161	20	A27	JK3	EIVLTWSPGTL LSPGERATLSC	RASQNVNR NYLV	WYQKPGQ APRLLY	GTSN RAT	GIPDRFSGSGSDFT LTSRLEPEDFAVYYC	QOYGSS PFT	FGPGTK VDIKR
	64	Línea germinal		OSVLTQPPSVSA APGQKVTISC	SGSSNIG NNYVS	WYQKPGQ APKLLIY	DNNK RPS	GIPDRFSGSGSDFT LTSRLEPEDFAVYYC	GTWDSS LSA-YV	FGTGTK VTV
sc 133	16	V1-19	JL1	OSVLTQPPSVSA APGQKVTISC	SGSSNIG NNYVS	WYQKPGQ APKLLIY	DNNK RPS	GIPDRFSGSKGTSAT LGITGLQTGDEADYYC	GTWDSS LSAGYV	FGTGTK VTV
	65	Línea germinal		OSVLTQPPSVSA APGQKVTISC	SGSSNIG NNYVS	WYQKPGQ APKLLIY	DNNK RPS	GIPDRFSGSKGTSAT LGITGLQTGDEADYYC	GTWDSS LSAVV	FGGGTK LTVL
sc 320	44	V1-19	JL2	OSVLTQPPSVSA APGQKVTISC	SGSSNIG NNYVS	WYQKPGQ APKLLIY	DNNK RPS	GIPDRFSGSKGTSAT LGITGLQTGDEADYYC	GTWDSS LSAGV	FGGGTK LTVL
	66	Línea germinal		SYELTQPPSVSV SPGQTARITC	SGDALPKK YAY	WYQKPGQ APKLLIY	EDSK RPS	GIPDRFSGSKGTSAT LGITGLQTGDEADYYC	YSTDSS GNHW	FGGGTK LTVL
sc 277	36	V2-7	JL2	SYELTQPPSVSV SPGQTARITC	SGDALPKK YAF	WYQKPGQ APKLLIY	DNNK RPS	GIPDRFSGSKGMSAT LGITGLQTGDEADYYC	YSTDSS GHHV	FGGGTK LTVL

(continuación)

Nombre de la cadena	No. SEQ ID:	V Kappa	J	FR1	RDC1	FR2	RDC2	FR3	RDC3	J
sc 97	12	V2-7	JL2	SYELTOPPSVSV SPGGTARITC	SGDALPKK YAY	WYQQKSGQ APVLVIY	EDIK RPS	GIPERFSGSSSGTMT LTISGAQVEDEADYYC	YSTDSS GNHWWF	FGGKTK LTVL
sc 58	67	Línea germinal	JL3	SYELTOPPSVSV SPGGTARITC	SGDALPKK YAY	WYQQKPGQ APVLVIY	EDSK RPS	GIPERFSGSSSGTMT LTISGAQVEDEADYYC	YSTDSS GNHWWF	FGGKTK LTVL
sc 298	68	Línea germinal	JL2	SYELTOPPSVSV SPGGTARITC	QGDLSRSY YAS	WYQQKPGQ APVLVIY	GKNN RPS	DIPDRFSGSGGTDFDFT LTISRLEPEDFAVYYC	NSRDSS HNHVV	FGGKTK LTVL
sc 264	69	Línea germinal	JL2	SYELTOPPSVSV SPGGTARITC	SGDVLAKK YAR	WYQQKPGQ APVLVIY	KQSE RPS	GIPDRFSGSGGTDFDFT LTISGAQVEDEADYYC	YSAADN NVV	FGGKTK LTVL

ES 2 746 925 T3

Tabla 10. Mutaciones ejemplares de la cadena pesada sc 133 (SEQ ID NO: 14) a la línea germinal (SEQ ID NO: 49) en el número de residuo indicado

54	57	70	76
N	G	M	T
N	G	L	I
N	G	L	T
N	D	M	I
N	D	L	I
N	D	M	T
N	D	L	T
K	G	M	I
K	G	M	T
K	G	L	I
K	G	L	T
K	D	M	I
K	D	L	I
K	D	M	T

Tabla 11. Mutaciones ejemplares de la cadena ligera sc 188 (SEQ ID NO: 24) a la línea germinal (SEQ ID NO: 61) en el número de residuo indicado

5

26	28	29	32	47
G	S	V	S	L
G	S	V	S	P
G	S	V	R	P
G	S	V	R	L
G	S	V	R	L
G	S	V	S	P
G	S	I	R	P
G	S	I	R	L
G	T	V	R	L
G	T	V	S	P
G	T	V	S	L
G	T	I	R	P
G	T	I	R	L
G	T	I	S	L
S	S	V	S	P

ES 2 746 925 T3

26	28	29	32	47
S	S	V	R	P
S	S	V	R	L
S	S	V	R	L
S	S	V	S	P
S	S	I	R	P
S	S	I	R	L
S	T	V	R	L
S	T	V	S	P
S	T	V	S	L
S	T	I	R	P
S	T	I	R	L
S	T	I	S	L

Tabla 12. Mutaciones ejemplares de la cadena pesada sc 188 (SEQ ID NO: 22) a la línea germinal (SEQ ID NO: 56) en el número de residuo indicado

33	37	45	60	78	83	85
G	S	K	Y	N	K	S
G	S	K	Y	N	K	T
G	S	K	Y	N	N	S
G	S	K	Y	N	N	T
G	S	K	Y	K	N	S
G	S	K	Y	K	N	T
G	S	K	Y	K	K	S
G	S	K	Y	K	K	T
G	S	K	S	N	K	S
G	S	K	S	N	K	T
G	S	K	S	N	N	S
G	S	K	S	N	N	T
G	S	K	S	K	N	S
G	S	K	S	K	N	T
G	S	K	S	K	K	S
G	S	K	S	K	K	T
G	S	N	Y	N	K	S
G	S	N	Y	N	K	T
G	S	N	Y	N	N	S

ES 2 746 925 T3

(continuación)

33	37	45	60	78	83	85
G	S	N	Y	N	N	T
G	S	N	Y	K	N	S
G	S	N	Y	K	N	T
G	S	N	Y	K	K	S
G	S	N	Y	K	K	T
G	S	N	S	N	K	S
G	S	N	S	N	K	T
G	S	N	S	N	N	S
G	S	N	S	N	N	T
G	S	N	S	K	N	S
G	S	N	S	K	N	T
G	S	N	S	K	K	S
G	S	N	S	K	K	T
V	S	K	Y	N	K	S
V	S	K	Y	N	K	T
V	S	K	Y	N	N	S
V	S	K	Y	N	N	T
V	S	K	Y	K	N	S
V	S	K	Y	K	N	T
V	S	K	Y	K	K	S
V	S	K	Y	K	K	T
V	S	K	Y	N	K	S
V	S	K	S	N	K	T
V	S	K	S	N	N	S
V	S	K	S	N	N	T
V	S	K	S	K	N	S
V	S	K	S	K	N	T
V	S	K	S	K	K	S
V	S	K	S	K	K	T
V	S	N	S	N	K	S
V	S	N	Y	N	K	T
V	S	N	Y	N	N	S
V	S	N	Y	N	N	T

ES 2 746 925 T3

(continuación)

33	37	45	60	78	83	85
V	S	N	Y	K	N	S
V	S	N	Y	K	N	T
V	S	N	Y	K	K	S
V	S	N	Y	K	K	T
V	S	N	Y	N	K	S
V	S	N	S	N	K	T
V	S	N	S	N	N	S
V	S	N	S	N	N	T
V	S	N	S	K	N	S
V	S	N	S	K	N	T
V	S	N	S	K	K	S
V	S	N	S	K	K	T
G	I	K	S	N	K	S
G	I	K	Y	N	K	T
G	I	K	Y	N	N	S
G	I	K	Y	N	N	T
G	I	K	Y	K	N	S
G	I	K	Y	K	N	T
G	I	K	Y	K	K	S
G	I	K	Y	K	K	T
G	I	K	Y	N	K	S
G	I	K	S	N	K	T
G	I	K	S	N	N	S
G	I	K	S	N	N	T
G	I	K	S	K	N	S
G	I	K	S	K	N	T
G	I	K	S	K	K	S
G	I	K	S	K	K	T
G	I	N	S	N	K	S
G	I	N	Y	N	K	T
G	I	N	Y	N	N	S
G	I	N	Y	N	N	T
G	I	N	Y	K	N	S

ES 2 746 925 T3

(continuación)

33	37	45	60	78	83	85
G	I	N	Y	K	N	T
G	I	N	Y	K	K	S
G	I	N	Y	K	K	T
G	I	N	Y	N	K	S
G	I	N	S	N	K	T
G	I	N	S	N	N	S
G	I	N	S	N	N	T
G	I	N	S	K	N	S
G	I	N	S	K	N	T
G	I	N	S	K	K	S
G	I	N	S	K	K	T
V	I	K	S	N	K	S
V	I	K	Y	N	K	T
V	I	K	Y	N	N	S
V	I	K	Y	N	N	T
V	I	K	Y	K	N	S
V	I	K	Y	K	N	T
V	I	K	Y	K	K	S
V	I	K	Y	K	K	T
V	I	K	Y	N	K	S
V	I	K	S	N	K	T
V	I	K	S	N	N	S
V	I	K	S	N	N	T
V	I	K	S	K	N	S
V	I	K	S	K	N	T
V	I	K	S	K	K	S
V	I	K	S	K	K	T
V	I	N	S	N	K	S
V	I	N	Y	N	K	T
V	I	N	Y	N	N	S
V	I	N	Y	N	N	T
V	I	N	Y	K	N	S
V	I	N	Y	K	N	T

(continuación)

33	37	45	60	78	83	85
V	I	N	Y	K	K	S
V	I	N	Y	K	K	T
V	I	N	Y	N	K	S
V	I	N	S	N	K	T
V	I	N	S	N	N	S
V	I	N	S	N	N	T
V	I	N	S	K	N	S
V	I	N	S	K	N	T
V	I	N	S	K	K	S
V	I	N	S	K	K	T

Tabla 13. Mutaciones ejemplares de la cadena ligera sc 264 (SEQ ID NO: 32) a la línea germinal (SEQ ID NO: 69) en el número de residuo indicado

31	36	84
Y	H	A
Y	H	D
Y	Q	A
S	H	D
S	Q	D
S	Q	A

5

Ejemplo 10

Determinación de la Potencia de los Anticuerpos $\alpha V\beta 6$

Para discriminar los anticuerpos en función de su capacidad para prevenir la adhesión de células HT29 al TGF β LAP, se realizó el siguiente ensayo de adhesión.

10 Las placas NuncMaxiSorp (Nunc) se recubrieron durante la noche con 50 μ l de 10 μ g/ml de TGF Beta1 LAP (TGF β LAP) y se bloquearon previamente con BSA/PBS al 3% durante 1 hora antes del ensayo. Las células HT29 que
 15 crecieron hasta la densidad óptima se sedimentaron y se lavaron dos veces en HBBS (con BSA al 1% y sin Mn²⁺), después de lo cual las células se resuspendieron en HBBS a 30,000 células por pocillo. El líquido de recubrimiento se retiró de las placas, que luego se bloquearon con 100 μ l de BSA al 3% a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se lavaron dos veces con PBS.

Las titulaciones de los anticuerpos se prepararon en diluciones en serie 1:3 en un volumen final de 30 μ l y en dos veces la concentración final. Se tuvo cuidado de garantizar que la concentración de PBS en los pocillos de control coincidiera con la concentración de PBS en el pocillo del anticuerpo más diluido. Se agregaron 30 μ l de células a cada pocillo y las células se incubaron en presencia de los anticuerpos a 4°C durante 40 minutos en una placa con fondo
 20 en forma de V. Las mezclas de anticuerpos celulares se transfirieron a la placa recubierta y la placa se incubó a 37°C durante 40 minutos. Las células de las placas recubiertas se lavaron luego cuatro veces en HBBS caliente y, a continuación, las células se congelaron a -80°C durante 15 minutos. Las células se dejaron descongelar a temperatura ambiente y luego se agregaron a cada pozo 100 μ de tampón de tinción/lisis CyQuant (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se leyó a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una
 25 longitud de onda de emisión de 530 nm. Se calculó un valor de IC₅₀ estimado para cada mAb basándose en la cantidad

máxima y mínima de la adhesión celular posible en el ensayo, según lo determinado por los pocillos de control positivo y negativo. Los resultados para doce anticuerpos se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultados de los Ensayos de Adhesión (Valores Estimados de IC₅₀)

	n=1 (ng/ml)	n=2 (ng/ml)	n=3 (ng/ml)
sc 049	>5000	>5000	>5000
sc 058	4065	2028	3259
sc 097	1006	281	536
sc 133	25	16	30
sc 161	2408	137	ND
sc 188	41	26	ND
sc 254	63	37	37
sc 264	26	14	18
sc 277	1455	540	720
sc 298	29	25	33
sc 320	648	381	415
sc 374	277	300	549
Control Positivo 2077Z	226	185	286

5 Ejemplo 11

Ensayo de competencia

Para establecer que los anticuerpos eran específicamente capaces de bloquear la unión de la integrina $\alpha\text{V}\beta 6$ a TGF β LAP soluble, se realizó un ensayo de competencia con los anticuerpos purificados para medir su capacidad para unirse a $\alpha\text{V}\beta 6$ y bloquear su unión a un péptido GST-LAP.

10 Las placas de 96 pocillos de unión al medio (Costar, catálogo # 3368) se recubrieron con 50 μl /pocillo de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de GST-LAP en PBS y azida de sodio al 0,05% y se incubaron durante la noche a 4°C. Luego, las placas se lavaron tres veces utilizando 300 μl /pocillo de diluyente de ensayo (leche al 1% en TBS (Tris 50 ml, 50 mM NaCl, MgCl₂ 1mM y CaCl₂ 1mM, pH 6.9), después de lo cual las placas se bloquearon utilizando 300 μl /pocillo de leche al 5% en TBS y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los mAb (en diluciones seriadas de 1:3 que oscilan entre 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se incubaron durante la noche con $\alpha\text{V}\beta 6$ (250 ng/ml en diluyente de ensayo que contiene 0.05% de azida de sodio). Al día siguiente, se transfirieron 50 μl /pocillo del anticuerpo primario preincubado a la placa recubierta con péptido GST-LAP y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron luego tres veces utilizando 300 μl /pocillo del diluyente de ensayo. Posteriormente, para detectar la cantidad de $\alpha\text{V}\beta 6$ unido a las placas, se añadió mAb 2075 (Chemicon) a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en diluyente del ensayo (50 μl /pocillo) y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los pocillos se lavaron tres veces con 300 μl /pocillo de diluyente del ensayo y se incubaron con IgG Fc-peroxidasa antimicrobiana de cabra a 400 ng/ml en diluyente del ensayo (50 μl /pocillo) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los pocillos se lavaron tres veces con 300 μl /pocillo del diluyente de ensayo y se desarrollaron usando TMB de 1 paso (Neogen) a un volumen total de 50 μl /pocillo. Después de 15 minutos, la reacción de desarrollo se detuvo con 50 μl /pocillo de ácido clorhídrico 1N. Las placas se leyeron a 450 nm y los resultados de cinco de los anticuerpos se resumen en la Figura 1, la cual muestra que los anticuerpos fueron capaces de inhibir la unión de $\alpha\text{V}\beta 6$ a GST-LAP.

Ejemplo 12

Reactividad Cruzada a Integrinas de $\alpha\text{V}\beta 3$ o $\alpha\text{V}\beta 5$

30 Para establecer que los anticuerpos eran funcionales solo contra la integrina $\alpha\text{V}\beta 6$ y no contra las integrinas $\alpha\text{V}\beta 3$ o $\alpha\text{V}\beta 5$, se realizó el siguiente ensayo para probar la capacidad de los anticuerpos para inhibir la adhesión celular de A375M a un péptido osteopontínico.

Las placas de ensayo se recubrieron con el péptido de osteopontina. Se utilizaron dos fragmentos de osteopontina: OPN 17-168 y OPN 17-314. Las placas de ensayo se bloquearon previamente con BSA al 3%/PBS durante una hora antes del ensayo. Las células A375M se retiraron de un matraz de cultivo, se sedimentaron y se lavaron dos veces con HBSS que contenía BSA al 1% y Ca^{2+} 1mM y Mg^{2+} 1mM. Las células se resuspendieron luego en HBSS a una concentración de 30,000 células por pocillo. Se eliminó el líquido de recubrimiento que contenía los fragmentos de osteopontina y se bloquearon las placas con 100 ml de BSA al 3% durante una hora a temperatura ambiente. Las placas recubiertas se lavaron dos veces con HBSS que contenía BSA al 1%. Las titulaciones de anticuerpos se prepararon en diluciones en serie 1:4 en un volumen final de 30 μl y al doble de la concentración final. Las células resuspendidas se agregaron a los pocillos que contenían el anticuerpo titulado en una placa con fondo en forma de V, y las células y los anticuerpos se incubaron conjuntamente a 4°C durante 40 minutos. La mezcla de anticuerpos-células se transfirió luego a la placa recubierta, que posteriormente se incubó a 37°C durante 40 minutos. Las células en las placas recubiertas se lavaron a continuación cuatro veces en HBSS caliente, y las células en las placas se congelaron luego a -80°C durante 15 minutos. Las células se dejaron descongelar a temperatura ambiente y se agregaron a cada pozo 100 μl de tampón de tinción/lisis CyQuant (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se leyó a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

Los resultados para cinco de los anticuerpos se resumen en la Tabla 15. Se utilizó como control positivo en este ensayo un anticuerpo específico de integrina αV disponible comercialmente y este mostró aproximadamente un 90% de inhibición de la adhesión. Un anticuerpo $\alpha\text{V}\beta 6$ disponible comercialmente sirvió como control negativo en este ensayo para la adhesión a integrinas $\alpha\text{V}\beta 3$ o $\alpha\text{V}\beta 5$. Todos los anticuerpos se probaron a una concentración de 5 como control positivo en este ensayo $\mu\text{g/ml}$ y ninguno de los anticuerpos de prueba pudo bloquear la adhesión a las integrinas $\alpha\text{V}\beta 3$ o $\alpha\text{V}\beta 5$.

Tabla 15. Reactividad Cruzada de Integrinas $\alpha\text{V}\beta 3$ o $\alpha\text{V}\beta 5$.

ID Anticuerpo	Porcentaje de Inhibición
sc 133	3
sc 188	-2
sc 254	-5
sc 264	3
sc 298	9
Control αV	89
Control $\alpha\text{V}\beta 6$	11
Control IgG de Humano	3
Control IgG de Ratón	5

25 Ejemplo 13

Reactividad Cruzada a la Integrina $\alpha 4\beta 1$

Para establecer que los anticuerpos eran funcionales solo contra la integrina $\alpha\text{V}\beta 6$ y no contra la integrina $\alpha 4\beta 1$, se realizó un ensayo para probar la capacidad de los anticuerpos para inhibir la adhesión de células J6.77 al péptido CS-1 de fibronectina. El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 12 mencionado anteriormente, con la excepción de que las células J6.77 se utilizaron para la unión y el péptido CS-1 de fibronectina se utilizó para recubrir las placas del ensayo.

Los resultados para 11 de los anticuerpos se muestran en la Tabla 16. Se utilizó un anticuerpo específico como control positivo de integrina $\beta 1$ disponible comercialmente en este ensayo y mostró una inhibición de la adhesión del 97%. Un anticuerpo específico disponible comercialmente de $\alpha\text{V}\beta 6$ sirvió como control negativo en este ensayo para la adhesión a $\alpha 4\beta 1$. Todos los anticuerpos se utilizaron a 5 $\mu\text{g/ml}$ y ninguno de los anticuerpos de prueba pudo bloquear la adhesión a $\alpha 4\beta 1$.

Tabla 16. Reactividad Cruzada de la Integrina $\alpha 4\beta 1$

Anticuerpo a 5 $\mu\text{g/ml}$	Porcentaje de Inhibición
sc 58	-14
sc 97	-7
sc 133	-15
sc 161	12
sc 188	-10
sc 254	0
sc 264	-8
sc 277	-17
sc 298	-7
sc 320	-8
sc 374	-8
IgG1 Humana	-6
IgG2 Humana	-9
Anticuerpo de integrina Anti-beta1	97
Anticuerpo de integrina Anti- $\alpha V\beta 6$	-15
Sin CS-1 o anticuerpo en las placas	12
Placas recubiertas con fragmentos de CS-1 sin anticuerpo	10

Ejemplo 14Reactividad Cruzada a la Integrina $\alpha 5\beta 1$

- 5 Para establecer que los anticuerpos eran funcionales solo contra la integrina $\alpha V\beta 6$ y no la integrina $\alpha 5\beta 1$, se realizó un ensayo de adhesión para probar la capacidad de los anticuerpos para inhibir la adhesión de células K562 a la fibronectina.

10 Las placas de ensayo se recubrieron con el péptido FN9-10 de fibronectina a una concentración de 12.5 $\mu\text{g/ml}$. Las placas de ensayo se bloquearon previamente con BSA al 3%/PBS durante una hora antes del ensayo. Las células K562 se retiraron de un matraz de cultivo, se sedimentaron y se lavaron dos veces con HBSS que contenía BSA al 1% y 1mM Mn^{2+} . Posteriormente las células se resuspendieron en HBSS a una concentración de 30,000 células por pocillo. Se eliminó el líquido de recubrimiento que contenía los fragmentos de osteopontina y se bloquearon las placas con 100 μl de BSA al 3% durante una hora a temperatura ambiente. Las placas recubiertas se lavaron dos veces con HBSS que contenía BSA al 1%. Las titulaciones de anticuerpos se prepararon en diluciones en serie 1:4 en un volumen final de 30 μl y al doble de la concentración final. Las células resuspendidas se agregaron a los pocillos que contenían el anticuerpo titulado en una placa con fondo en forma de V, y las células y los anticuerpos se incubaron conjuntamente a 4°C durante 60 minutos. La mezcla de anticuerpos-células se transfirió luego a la placa recubierta, que posteriormente se incubó a 37°C durante 40 minutos. Las células en las placas recubiertas se lavaron a continuación cuatro veces en HBSS caliente, y las células en las placas se congelaron luego a -80°C durante 15 minutos. Las células se dejaron descongelar a temperatura ambiente y posteriormente se agregaron a cada pozo 100 μl de tampón de tinción/lisis CyQuant (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se leyó a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

15

20

Los resultados de cinco de los anticuerpos se resumen en la Tabla 17. Los anticuerpos de prueba se compararon con un anticuerpo comercialmente disponible $\alpha 5\beta 1$ como control positivo y un anticuerpo específico $\alpha V\beta 6$ como control negativo. Ninguno de los anticuerpos de prueba pudo bloquear la adhesión en el ensayo a la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ utilizada en este ensayo.

5 Tabla 17. Reactividad Cruzada de la Integrina $\alpha 5\beta 1$

ID Anticuerpo	Porcentaje de Inhibición
sc 133	-12
sc 188	5
sc 254	-9
sc 264	-4
sc 298	2
Control $\alpha V\beta 6$	7
Control $\alpha 5\beta 1$	78
Control IgG Humana	11

Ejemplo 15

Reactividad Cruzada a la Integrina $\alpha V\beta 6$ de Murino y Mono cangrejero

10 Para determinar si los anticuerpos mostraban reactividad cruzada con $\alpha V\beta 6$ de ratón o $\alpha V\beta 6$ de mono cangrejero, se realizó el siguiente ensayo.

La reactividad cruzada de los mAbs de $\alpha V\beta 6$ de macaco y de ratón se probó en los mAbs purificados utilizando un análisis FACS en células HEK-293 transfectadas transitoriamente con αV , $\beta 6$ o $\alpha V\beta 6$ de mono cangrejero o de ratón. Aproximadamente 48 horas después de la transfección, las células se cosecharon y se resuspendieron en tampón FACS para alcanzar una concentración final de aproximadamente 50,000 células en 100 μl .

15 Se utilizaron aproximadamente 100,000 células en total en cada reacción de la siguiente manera. Se dispensaron 200 μl de 293 células en una placa con fondo en forma de V. Las células en la placa se sedimentaron a 1500 rpm durante 3 minutos y luego se resuspendieron en 100 μl de tampón FACS. Se repitió la etapa de sedimentación y se eliminó el sobrenadante de tampón FACS. Los mAbs purificados, o los anticuerpos primarios de control, se agregaron en un volumen de 50 μl y las células se resuspendieron. Los controles de anticuerpos primarios fueron $\alpha V\beta 6$ murinos (Cat #MAB2077z, Chemicon) y anti- αV y anti- $\beta 6$ recombinantes. La placa se incubó en hielo durante 45 minutos, después de lo cual se agregaron 100 μl de tampón FACS para diluir a el anticuerpo primario. Las células se sedimentaron a continuación mediante centrifugación a 1500 rpm durante 3 minutos, y el sedimento se resuspendió en 100 μl de tampón FACS. Se repitió la etapa de sedimentación y se eliminó el sobrenadante de tampón FACS. Las células se resuspendieron posteriormente en el anticuerpo secundario apropiado (5 $\mu\text{g/ml}$) con colorante 7AAD (10 $\mu\text{g/ml}$) y se tiñeron en hielo durante 7 minutos. Posteriormente se agregaron 150 μl de tampón FACS y las células se sedimentaron a 1500 rpm durante 3 minutos, después de lo cual las células se lavaron en 100 μl de tampón FACS, se sedimentaron y luego se resuspendieron en 250 μl de tampón y se agregaron a los tubos FACS. Las muestras se analizaron en una máquina FACS de alto rendimiento y se analizaron utilizando el software Cell Quest Pro.

30 Los resultados se resumen en la Tabla 18, y demuestran que mAb sc 133 y mAb sc 188 fueron claramente de reactividad cruzada con $\alpha V\beta 6$ y $\beta 6$ de ratón y $\alpha V\beta 6$ y $\beta 6$ de mono cangrejero. El mAb sc 254 pareció reaccionar de forma cruzada con $\beta 6$, αV y $\alpha V\beta 6$. Los mAbs sc 264 y 298 tenían altos niveles de unión a las células parentales, lo que dificultaba el discernimiento de la reactividad cruzada de las especies.

Tabla 18. Reactividad Cruzada de $\alpha V\beta 6$ con Ratón y Mono cangrejero

Anticuerpos	Parental	alfaV de Ratón	beta6 de Ratón	alfaVbeta6 de Ratón	alfaV de Mono cangrejero	beta6 de Mono cangrejero	alfaVbeta6 de Mono cangrejero
Solo células	0	0	0	0	1	0	0

Anticuerpos	Parental	alfaV de Ratón	beta6 de Ratón	alfaVbeta6 de Ratón	alfaV de Mono cangrejero	beta6 de Mono cangrejero	alfaVbeta6 de Mono cangrejero
Gt anti Ratón	0	0	0	0	0	0	0
anti alfaVbeta6	0	1	11	45	0	5	20
anti alfaV	68	68	63	59	68	69	67
anti beta6	0	0	0	0	0	0	0
Gt anti Humano	0	0	0	0	0	0	0
IgG1 Humana	0	1	0	1	1	1	0
sc 133	2	4	19	49	5	10	28
sc 188	1	3	29	51	2	17	27
sc 254	8	13	21	50	16	19	26
sc 264	74	71	68	63	70	75	54
sc 298	49	45	52	53	48	52	38

Los datos representan el porcentaje de células desplazadas

Ejemplo 16

Ensayo de Internalización

5 La internalización de los anticuerpos se probó utilizando una línea celular K562 que expresaba de forma estable a $\alpha V\beta 6$ humana. La internalización de los anticuerpos purificados se comparó con un anticuerpo $\alpha V\beta 6$ disponible comercialmente que no se internalizó en este ensayo.

Los resultados se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19. Sumario del Ensayo de Internalización

Anticuerpo	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Porcentaje de Internalización
sc 133	10	28%
sc 133	1	30%
sc 188	10	38%
sc 188	1	34%
sc 254	10	49%
sc 254	1	39%
sc 264	10	76%
sc 264	1	77%
sc 298	10	28%
sc 298	1	26%

Análisis de Biacore de Alta Resolución

El análisis Biacore de alta resolución que utiliza una proteína soluble $\alpha V\beta 6$ para unirse a los anticuerpos inmovilizados en chips CM5 se realizó para 5 de los anticuerpos $\alpha V\beta 6$ para estimar su afinidad por el antígeno soluble.

5 El análisis Biacore se realizó de la siguiente manera. Se preparó una superficie de anticuerpo IgG humano α de cabra de alta densidad sobre dos chips Biacore CM5 utilizando un acoplamiento de amina de rutina. Cada mAb se diluyó en HBS-P desgasificado que contenía 100 $\mu\text{g/ml}$ de BSA, 1mM MgCl_2 y 1mM CaCl_2 hasta alcanzar una concentración de aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$. Más precisamente, mAb sc 133 se diluyó a 0.98 $\mu\text{g/ml}$, mAb sc 188 se diluyó a 0.96 $\mu\text{g/ml}$, mAb sc 264 se diluyó a 0.94 $\mu\text{g/ml}$, mAb sc 254.2 se diluyó a 0.87 $\mu\text{g/ml}$ y mAb sc 298 se diluyó a 1.6 $\mu\text{g/ml}$.
 10 Posteriormente, se desarrolló un protocolo de nivel de captura para cada mAb al capturar cada mAb sobre una celda de flujo separada a un caudal de 10 $\mu\text{l/min}$ en las concentraciones enumeradas anteriormente. Los mAbs sc 133, sc 298 y sc 254.2 se capturaron durante 30 segundos, mientras que los mAbs sc 188 y sc 264 se capturaron durante 1 minuto. Le siguió una etapa de lavado de 4 minutos a 50 $\mu\text{l/min}$ para estabilizar la línea basal de mAb.

15 Se inyectó $\alpha V\beta 6$ soluble durante 4 minutos a un rango de concentración de 116 - 3.6 nM para mAbs sc 133, sc 188, sc 264 y sc 298, y 233 - 3.6 nM para mAb sc 254.2, con una dilución en serie 2x para cada intervalo de concentración. Una disociación de 10 minutos siguió a cada inyección de antígeno. Las muestras de antígeno se prepararon en el funcionamiento de HBS-P descrito anteriormente. Todas las muestras se inyectaron aleatoriamente por triplicado, con varios ciclos de captura de mAb/inyección de tampón intercalados para una doble referencia. Las superficies del anticuerpo de ratón α de cabra de alta densidad se regeneraron con un pulso de 18 segundos de ácido fosfórico 146 mM (pH 1.5) después de cada ciclo a un caudal de 100 $\mu\text{l/min}$. Se utilizó un caudal de 50 $\mu\text{l/min}$ para todos los ciclos de inyección de antígeno.
 20

Los datos se ajustaron a un modelo de interacción 1:1 con la inclusión de un término para el transporte masivo utilizando CLAMP. Las constantes de unión resultantes se enumeran en la Tabla 20. Los mAb se enumeran de mayor a menor afinidad.

25 Tabla 20. Resultados de la Determinación de Afinidad para mAbs Clonados y Purificados Derivados de Biacore™ de alta resolución

Anticuerpo	R_{max}	k_a ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)
sc 265	96	5.85×10^4	3.63×10^4	6.2
sc 298	77	5.65×10^4	1.18×10^4	21.0
sc 188	76	4.52×10^4	9.56×10^4	21.2
sc 133	96	5.73×10^4	1.89×10^4	33.0
sc 254.2	53,45	5.73×10^4	5.64×10^4	34.9

Ejemplo 18

Análisis de Afinidad de Unión Utilizando FACS

30 Como alternativa a Biacore, el análisis de FACS también se utilizó para estimar la afinidad de unión de uno de los anticuerpos a células K562 que expresan de manera estable a el antígeno $\alpha V\beta 6$ humano. La cantidad de antígeno se tituló para generar una curva de unión y estimar la afinidad de unión al antígeno.

35 Las células K562 que expresaban $\alpha V\beta 6$ se resuspendieron en tampón HBS filtrado que contenía MgCl_2 1 mM y CaCl_2 1 mM a una concentración de aproximadamente 6 millones de células/ml. Las células se mantuvieron en hielo. El mAb sc 188 purificado se diluyó en serie por un factor de 1:2 en HBS en 11 pocillos en una placa de 96 pocillos. El doceavo pozo en cada fila contenía solamente a el tampón. Las titulaciones se realizaron por triplicado. Se agregaron HBS y células adicionales a cada pocillo, de modo que el volumen final fue de 300 $\mu\text{l/pocillo}$ y cada pocillo contenía aproximadamente 120,000 células. El intervalo de concentración molecular final para mAb sc 188 fue de 4.9 - 0.019 nM. Las placas se colocaron en un agitador de placas durante 5 horas a 4°C, después de lo cual las placas se centrifugaron y se lavaron tres veces con HBS, después de lo cual, 200 μl de anticuerpo policlonal $\alpha 5$ de cabra Cy5 131 nM (Jackson Laboratories, #109 -175-008) se agregaron a cada pozo. Las placas se agitaron posteriormente durante 40 minutos a 4°C, y después se giraron y se lavaron, una vez más, tres veces con HBS. La Fluorescencia Media Geométrica (FGM) de 20,000 "eventos" para cada concentración de mAb se registró utilizando un instrumento FACSCalibur, y los puntos de titulación por triplicado correspondientes se promediaron para dar un punto de FGM para cada concentración de mAb. Una gráfica del FGM promediado en función de la concentración de mAb molecular
 40 para cada concentración de mAb. Una gráfica del FGM promediado en función de la concentración de mAb molecular con el software de Scientist se ajustó de manera no lineal utilizando la ecuación:
 45

$$F = P' \frac{(K_D + L_T + n \cdot M) - \sqrt{(K_D + L_T + n \cdot M)^2 - 4n \cdot M \cdot L_T}}{2} + B$$

En la ecuación anterior, F = fluorescencia media geométrica, LT = concentración de mAb molecular total, P'= constante de proporcionalidad que relaciona unidades de fluorescencia arbitrarias para mAb unido, M = concentración celular en molaridad, n = número de receptores por celda, B = señal de fondo y K_D = constante de disociación en equilibrio. Para el mAb sc 188 se obtiene una estimación de K_D ya que P', n, B y K_D pueden flotar libremente en el análisis no lineal.

La gráfica resultante con sus ajustes no lineales (línea roja) se muestra en la Figura 2. La Tabla 21 enumera el K_D resultante para el mAb sc 188 junto con el intervalo de confianza del 95% al ajuste. Estos resultados para mAb sc 188 indican la unión a un tipo de receptor.

La afinidad de unión para sc 188 determinada por FACS fue significativamente más estrecha que la determinada por Biacore (Ejemplo 17). Hay al menos 2 explicaciones posibles para la diferencia en los valores de K_D para sc 188. La primera razón es que los dos ensayos utilizan diferentes formas del antígeno para la medición: Biacore utilizó antígeno soluble y el análisis de FAC utilizó una forma unida a célula de el antígeno La segunda razón es que los anticuerpos que se probaron se generaron contra la forma del antígeno unida a la célula y pueden no unirse con una afinidad tan alta al antígeno soluble como lo hacen al antígeno unido a la célula.

Tabla 21. Análisis de Afinidad de Unión Mediante FACS

Anticuerpo	K _D (pM)	95% CI (pM)
sc 188	51.9	±22.7

Ejemplo 19

Ensayo de CDC

Los anticuerpos purificados descritos en los ejemplos anteriores son del isotipo IgG1 y pueden tener una función efectora. Con la finalidad de determinar la capacidad de estos anticuerpos para mediar en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), se realizó el siguiente ensayo utilizando células 293 que expresan establemente a αVβ6 (293-10A11) y células parentales 293 (293F).

Para la tinción con calceína de células, se resuspendieron de forma individual partes alícuotas de aproximadamente 25 X 10e6 de células HT29, 293-10A11 y 293F en 3 ml de medio RPMI sin suero. Luego se agregaron 45 µl de calceína 1mM a cada muestra de 3 ml de células y las muestras se incubaron a 37°C durante 45 minutos. Las células se centrifugaron a 1200 x RPM durante 3 minutos, el sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en cada medio de cultivo de cada línea celular respectiva. La etapa de centrifugación se repitió y las células se resuspendieron para dar una concentración final de aproximadamente 100,000 células en 50 µl de medio.

Las diluciones en serie 1:2 de cada anticuerpo se prepararon en una placa de 96 pocillos con fondo en forma de V, con concentraciones que oscilan entre 20 µg/ml y 0.625 µg/ml en un volumen de 50 µl. Posteriormente, se agregaron 100,000 de las células preparadas como se describió anteriormente en un volumen de 50 µl a las placas que contienen anticuerpos, y la mezcla resultante se incubó en hielo durante dos horas. Después de la incubación, las células se sedimentaron y el sobrenadante se descartó. Las células se resuspendieron en 100 µl de sus medios respectivos que contenían un 10% de suero humano (donador ABI#27) y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Las células se centrifugaron y se transfirieron 80 µl del sobrenadante a una placa FMAT. La placa se leyó en un lector Tecan utilizando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

Los resultados se resumen en las Figuras 3A-3E, y demuestran que cada anticuerpo purificado analizado es capaz de mediar CDC en células 293 que expresan de forma estable a la integrina αVβ6.

Ejemplo 20

Mutagénesis sitio-dirigida

Uno de los anticuerpos (sc 264) preparados a partir de las inmunizaciones (Ejemplo 1) mostró una fuerte actividad de bloqueo funcional *in vitro* en el ensayo de inhibición de la unión a TGFβLAP (véase el Ejemplo 4), pero mostró una unión de reactividad cruzada a líneas celulares que no expresan αVβ6 (véase Ejemplo 15). Este anticuerpo, sc 264, tiene una secuencia RGD en la región RDC3, que se presume que es responsable de la unión de reactividad cruzada. Por lo tanto, se utilizó sitio-mutagénesis dirigida para reemplazar el residuo de glicina en el RGD con una alanina (sc 264 RAD).

Un anticuerpo secundario (sc 188) tiene un sitio de glicosilación dentro de la región FR3. Este sitio se eliminó mediante mutagénesis dirigida al sitio con una sustitución de NLT a KLT (sc 188 SDM). Las versiones mutadas de estos dos anticuerpos se expresaron y purificaron como se describe en los Ejemplos 7 y 8, y los anticuerpos purificados se analizaron como se describe en los siguientes ejemplos.

5 Ejemplo 21

Ensayo de Enlace a Prueba

Reactividad Cruzada de Unión a Anticuerpos Mutantes

Se realizó un ensayo de unión para probar si la unión de reactividad cruzada observada en el Ejemplo 15 se redujo debido a la mutagénesis dirigida al sitio de sc 264. La unión de los anticuerpos se analizó en las líneas celulares 293T y 293F para probar que si se eliminaba el sitio RGD de sc 264 daría como resultado una disminución de la unión en comparación con el anticuerpo original.

Las células 293T y 293F se centrifugaron después de la recolección y se resuspendieron en HBSS con BSA al 1% y CaCl₂ 1mM y MgCl₂ 1mM (tampón de lavado), de modo que se utilizaron al menos 150,000 células en cada reacción. Las células se dividieron entre las reacciones en una placa de 96 pocillos con fondo en forma de V (Sarstedt), y las células en la placa se sedimentaron a 1500 rpm durante 3 minutos, después de que se eliminó el sobrenadante HBSS. El anticuerpo primario se añadió a la concentración indicada en la Tabla 19 en un volumen de 50 µl, y las células se resuspendieron y luego se incubaron en hielo durante 60 minutos. Después de la incubación, las células se sedimentaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 3 minutos, se resuspendieron en 100 µl de tampón de lavado y luego se sedimentaron nuevamente. Las células se resuspendieron luego en el anticuerpo secundario apropiado a 2 µg/ml con 10 µg/ml de 7 AAD y se tiñeron en hielo durante 7 minutos, después de lo cual se agregaron 150 µl de tampón de lavado, y las células se sedimentaron a 1500 rpm durante 3 minutos y posteriormente se resuspendieron en 100 µl de HBSS con BSA al 1%. Las muestras se leyeron en una máquina FACS con un accesorio HTS y los datos se analizaron utilizando el software Cell Quest Pro. Los resultados se resumen en la Tabla 22, y los datos aparecen como valores de cambio medio geométrico en unidades arbitrarias. Estos datos demuestran que, a todas las concentraciones analizadas, sc 264 RAD tenía una unión significativamente menor a las células 293T parentales en comparación con el mAb sc 264 original.

Tabla 22. Reactividad cruzada de anticuerpos mutados contra células parentales.

Anticuerpo	Concentración (µg/ml)	Células 293T	Células 293T- αVβ6
Vacío	n/a	3	2
IgG2a de ratón	20	27	8
IgG1 Humano	20	4	4
Anti-αVβ6	20	4	5
sc 264	20	433	6673
sc 264 RAD	20	44	7241
sc 188	20	27	6167
sc 188 SDM	20	25	6758
sc 264	5	88	6418
sc 264 RAD	5	13	6840
sc 188	5	9	5822
sc 188 SDM	5	9	6822
sc 264	1.25	24	6230
sc 264 RAD	1.25	7	4890
sc 188	1.25	6	6396
sc 188 SDM	1.25	5	4532

Ejemplo 22

Análisis de Potencia de Anticuerpos Mutantes

Con el fin de determinar la concentración (IC₅₀) de los anticuerpos αVβ6 mutantes necesarios para inhibir la adhesión mediada por TGFβLAP de las células HT-29, se realizó el siguiente ensayo.

5 Las placas Nunc Maxisorp (Nunc) se recubrieron durante la noche con 50 µl de 10 µg/ml de TGF Beta1 LAP (TGFβLAP) y se bloquearon previamente con BSA/PBS al 3% durante 1 hora antes del ensayo. Las células HT29 que crecieron hasta la densidad óptima se sedimentaron y se lavaron dos veces en HBSS (con BSA al 1% y con Ca²⁺ 1mM y Mg²⁺ 1 mM), después de lo cual las células se resuspendieron en HBSS a 30,000 células por pocillo. El líquido de recubrimiento se retiró de las placas, que luego se bloquearon con 100 µl de BSA al 3% a temperatura ambiente durante 1 hora y posteriormente se lavaron dos veces con PBS.

10 Las titulaciones de anticuerpos se prepararon en diluciones en serie 1:4 en un volumen final de 30 µl y en dos veces la concentración final. Se tuvo cuidado de garantizar que la concentración de PBS en los pocillos de control coincidiera con la concentración de PBS en el pocillo de anticuerpo más diluido. Se agregaron 30 µl de células a cada pocillo y las células se incubaron en presencia de los anticuerpos a 4°C durante 40 minutos en una placa con fondo en forma de V. Las mezclas de anticuerpos celulares se transfirieron a la placa recubierta y la placa se incubó a 37°C durante 40 minutos. Las células de las placas recubiertas se lavaron luego cuatro veces en HBSS caliente y, a continuación, las células se congelaron a -80°C durante 15 minutos. Las células se dejaron descongelar a temperatura ambiente y luego se agregaron a cada pozo 100 µl de tampón de tinción/lisis CyQuant (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se leyó a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. Los resultados para doce anticuerpos se resumen en la Tabla 23 y demuestran que la IC₅₀ de los anticuerpos mutantes es consistentemente menor que la de cada anticuerpo original.

Tabla 23. Concentración (IC₅₀) de anticuerpos mutantes requeridos para inhibir la adhesión mediada por TGFβLAP de células HT29.

	n=1 (ng/ml)	n=2 (ng/ml)	n=3 (ng/ml)
sc 264	113	96	55
sc 264 RAD	13	13	39
sc 264	57	89	46
sc 188	125	157	64
sc 188 SDM	22	24	67

Ejemplo 23

La Reactividad Cruzada de Anticuerpos Mutantes para la Integrina αβ1

Para establecer que los anticuerpos mutantes eran funcionales solamente contra la integrina αVβ6 y no la integrina α4β1, se realizó un ensayo para probar la capacidad de los anticuerpos para inhibir la adhesión de células J6.77 al péptido CS-1 de fibronectina. El ensayo se realizó como se describe a continuación.

30 Las placas de ensayo se recubrieron con el péptido CS-1 de la fibronectina. Las placas de ensayo se bloquearon previamente con BSA al 3%/PBS durante una hora antes del ensayo. Las células J6.77 se crecieron hasta la confluencia, luego se retiraron de un matraz de cultivo, se sedimentaron y se lavaron tres veces con HBSS. Las células se resuspendieron posteriormente en HBSS a una concentración de 30,000 células por pocillo. El líquido de recubrimiento que contenía a los fragmentos de fibronectina se retiró y las placas se bloquearon con 100 µl de BSA al 3% durante una hora a temperatura ambiente. Las placas recubiertas se lavaron tres veces con HBSS. Las titulaciones de anticuerpos se prepararon en diluciones en serie 1:4 en un volumen final de 30 µl y al doble de la concentración final. Las células resuspendidas se agregaron a los pocillos que contenían el anticuerpo titulado en una placa con fondo en forma de V, y las células y los anticuerpos se incubaron conjuntamente a 4°C durante 40 minutos. La mezcla de anticuerpo-células se transfirió luego a la placa recubierta, que luego se incubó a 37°C durante 40 minutos. Las células en las placas recubiertas se lavaron a continuación cuatro veces en HBSS caliente, y las células en las placas se congelaron luego a -80°C durante 15 minutos. Las células se dejaron descongelar a temperatura ambiente y luego se agregó a cada pozo 100 µl de tampón de tinción/lisis CyQuant (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se leyó a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm.

45 Los resultados para los dos anticuerpos mutantes y sus homólogos no mutantes se resumen en la Tabla 24. Se utilizó un anticuerpo disponible comercialmente específico para la integrina β1 como control positivo en este ensayo y mostró

una inhibición de la adhesión del 95%. Un anticuerpo disponible comercialmente específico de $\alpha V\beta 6$ sirvió como control negativo en este ensayo para la adhesión a $\alpha 4\beta 1$. Todos los anticuerpos se utilizaron a 5 $\mu\text{g/ml}$ y ninguno de los anticuerpos de prueba pudo bloquear la adhesión a $\alpha 4\beta 1$.

Tabla 24. Reactividad Cruzada a la Integrina $\alpha 4\beta 1$

Anticuerpo a 5 $\mu\text{g/ml}$	Porcentaje de Inhibición
sc 188	2
sc 188 SDM	-6
sc 264	-30
sc 264 RAD	-2
IgG1 Humana	26
IgG2 Humana	13
IgG4 Humana	15
Integrina Anti-beta	95

5

Ejemplo 24

Reactividad Cruzada de Anticuerpos Mutantes a la Integrina $\alpha 5\beta 1$

Para establecer que los anticuerpos mutantes solo eran funcionales contra la integrina $\alpha V\beta 6$ y no contra la integrina $\alpha 5\beta 1$, se realizó un ensayo para probar la capacidad de los anticuerpos para inhibir la adhesión de las células K562 a la fibronectina. El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 14. Los resultados se resumen en la Tabla 25 y demuestran que ninguno de los anticuerpos probados podría bloquear la adhesión a $\alpha 5\beta 1$.

10

Tabla 25. Reactividad cruzada a la integrina $\alpha 5\beta 1$

ID Anticuerpo	% Inhibición
sc 188	-5
sc 188 SDM	-8
sc 264	3
sc 264 RAD	6
Control $\alpha V\beta 6$	-16
Control $\alpha 5\beta 1$	78
Control IgG Humana	-12

Ejemplo 25

15 Reactividad cruzada de Anticuerpos Mutantes de Integrina $\alpha V\beta 6$ de Ratón y de Mono Cangrejero

Con la finalidad de determinar si los anticuerpos específicos de $\alpha V\beta 6$ mutantes exhiben reactividad cruzada con $\alpha V\beta 6$ de ratón o $\alpha V\beta 6$ de mono cangrejero, se realizó el siguiente ensayo.

Las células parentales K562, o las células K562 que expresan $\alpha V\beta 6$ de mono cangrejero o de ratón se centrifugaron después de la recolección y se resuspendieron en HBSS con BSA al 1% y CaCl_2 1mM y MgCl_2 1mM (tampón de lavado), de manera que al menos 150,000 células se utilizaron en cada reacción. Las células se dividieron entre las reacciones en una placa de 96 pocillos con fondo en forma de V (Sarstedt) y las células en la placa se sedimentaron a 1500 rpm durante 3 minutos, después de lo cual se eliminó el sobrenadante de HBSS. El anticuerpo primario se agregó en un volumen de 50 μl , y las células se resuspendieron y luego se incubaron en hielo durante 60 minutos. Después de la incubación, las células se sedimentaron mediante centrifugación a 1500 rpm durante 3 minutos, se resuspendieron en 100 μl de tampón de lavado y posteriormente se sedimentaron nuevamente. Las células se resuspendieron luego en

25

- 5 el anticuerpo secundario apropiado a 2 µg/ml con 10 µg/ml de 7 AAD y se tiñeron en hielo durante 7 minutos, después de lo cual se agregaron 150 µl de tampón de lavado, y las células se sedimentaron a 1500 rpm durante 3 minutos y luego se resuspendieron en 100 µl de HBSS con BSA al 1%. Las muestras se leyeron en una máquina FACS con un accesorio HTS y los datos se analizaron utilizando el software Cell Quest Pro. Los resultados se resumen en la Tabla 26, y los datos aparecen como valores de cambio medio geométrico en unidades arbitrarias. Estos datos demuestran que, en las concentraciones analizadas, sc 264 RAD y sc 188 SDM exhiben reactividad cruzada con αVβ6 de ratón y de mono cangrejero.

Tabla 26. Reactividad cruzada de αVβ6 con ratón y mono cangrejero

Anticuerpos	Parental	alfaVbeta6 de Ratón	alfaVbeta6 de Mono cangrejero
Solo células	3	3	3
Gt anti Ratón	5	6	7
anti alfaVbeta6	15	122	84
anti alfaV	109	144	163
anti beta6	26	43	37
IgG2a de Ratón	23	36	25
IgG1 de Ratón	12	20	13
Gt anti Humano	7	12	7
IgG1 Humana	46	108	54
sc 133	57	246	154
sc 188	55	227	139
sc 188 SDM	47	219	142
sc 254	98	260	190
sc 264	33	160	121
sc 264 RAD	48	196	139
sc 298	33	150	97

10 **Ejemplo 26**

Ensayo de Internalización

La internalización de los anticuerpos mutantes se probó utilizando una línea celular K562 que expresaba de forma estable a αVβ6 humana. El ensayo se realizó como se describe en el Ejemplo 15. La internalización de los anticuerpos purificados se comparó con un anticuerpo disponible comercialmente αVβ6 que no se internalizó en este ensayo.

- 15 Los resultados se resumen en la Tabla 27, y demuestran que el anticuerpo mutante sc 264 RAD se internaliza significativamente menos que el sc 264 no mutado.

Tabla 27. Sumario del Ensayo de Internalización

Anticuerpo	Concentración (µg/ml)	Porcentaje de Internalización
sc 264	10	75%
sc 264	1	47%
sc 264 RAD	10	42%
sc 264 RAD	1	31%

Anticuerpo	Concentración (µg/ml)	Porcentaje de Internalización
sc 188	10	18%
sc 188	1	27%
sc 188 SDM	10	22%
sc 188 SDM	1	17%

Ejemplo 27

Análisis de Afinidad de Unión del sc 264 RAD Utilizando FACS

5 La afinidad de unión a $\alpha\beta6$ del anticuerpo sc 264 RAD se midió como se describe en el Ejemplo 18. Los resultados de este ensayo se resumen en la Tabla 28, y demuestran que el anticuerpo sc 264 RAD tiene una afinidad <50 pM

Tabla 28. Análisis de Afinidad de Unión Utilizando FACS

Muestra mAb	K_D (pM)	95% CI (pM)
sc 264 RAD	46.3	± 15.9

Ejemplo 28

Comparación de la Actividad de sc 264 RAD con sc 264 RAD/ADY

10 La actividad del anticuerpo sc 264 RAD y la versión con línea germinal (GL) de 264RAD (que contiene la mutación A84D en la cadena ligera), 264 RAD/ADY se comparó en un ensayo de adhesión Detroit-562.

15 Las placas se recubrieron con 0.5 µg/ml de proteína de fusión GST-TGF- β LAP a 4°C durante la noche y a la mañana siguiente, se lavaron y luego se bloquearon con BSA al 3%/PBS durante 1 hora. Las células Detroit-562 (25000 células por pocillo) se dejaron adherir a las placas durante 45 minutos a 37°C en HBSS que contenía $MgCl_2$ 2 mM. Después de 45 minutos, las placas se lavaron tres veces en PBS y luego se fijaron en etanol. Las células se visualizaron mediante tinción con Hoescht y se cuantificaron contando el número de células unidas por pocillo en un Cellomics Arrayscan II.

Los datos mostrados en la Figura 5 indican que tanto sc 264 RAD como sc 264 RAD/ADY tienen una actividad similar y que la capacidad de bloquear la función de $\alpha\beta6$ se mantiene en el anticuerpo modificado.

20 **Ejemplo 29**

Estudio de Crecimiento

25 Para establecer que los anticuerpos 264RAD, 133 y 188 SDM bloquean la función $\alpha\beta6$ *in vivo*, cada uno se probó para determinar la capacidad de inhibir el crecimiento del xenoinjerto de tumor positivo para $\alpha\beta6$. Uno de estos modelos es la línea celular nasofaríngea Detroit-562, que expresa a $\alpha\beta6$ y que también crece como un xenoinjerto de tumor subcutáneo.

30 Las células Detroit 562 se cultivaron en EMEM con BSS de Earle y L-Glu 2 mM + piruvato de sodio 1.0 mM, NEAA 0.1 mM + bicarbonato de sodio 1.5 g/l + FBS al 10%. Las células se recogieron y se resuspendieron en 50% de PBS + 50% de matrigel. La suspensión se implantó luego a 5×10^{-6} por ratón en un volumen de 0.1 ml dentro del flanco derecho. Los animales eran ratones hembra NCR de 6 a 8 semanas de edad. La dosificación se inició cuando los tumores alcanzaron 0.1 cm³ y se administraron 20 mg/kg una vez a la semana durante la duración del estudio.

Los tres anticuerpos inhibieron el crecimiento del tumor (véase figura 4). 264RAD fue el más efectivo, seguido de 133 y de 188. Este dato muestra claramente que los anticuerpos 264RAD, 133 y 188 son activos *in vivo* y pueden reducir el crecimiento de un tumor dependiente de la señalización de $\alpha\beta6$ para el crecimiento.

Tabla 29. Secuencia de Aminoácidos de la Cadena Pesada de Anticuerpos ejemplares

Nombre de la cadena	No. SEQ ID:	FR1	RDC1	FR2	RDC2	FR3	RDC3	FR4
sc 264 RAD	75	QVQLQESGPGLVK PSQTLSTCTVS	GGSSGG GYYS	WIRQHPGKGLEWIG	YIYSGRTYNNP SLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLS AVTAADTAVYYCAR	VATGRADYH FYAMDV	WGQGTTVT VSS
sc 264 RAD/ADY	95	QVQLQESGPGLVK PSQTLSTCTVS	GGSSGG GYYS	WIRQHPGKGLEWIG	YIYSGRTYNNP SLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLS AVTAADTAVYYCAR	VATGRADYH FYAMDV	WGQGTTVT VSS
sc 188 SDM	71	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVCSCKAS	GGSSGG VYYWT	WIRQHPGKGLEWIG	YIYSGRTYNNP SLKS	RVTISVDTSKNQFSLKLS AVTAADTAVYYCAR	EGPLRGDYY YGLDV	WGQGTTVT VSS
sc 133 TMT	79	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVCSCKAS	GUTFTGY YMH	WVRQAPGGGLEWWMG	WINPKSGDTNYA QKFGQ	RVTMTTRDTSTSTAYMELS RLRSDDTAVYYCAR	RLDV	WGQGTTVT VSS
sc 133 WDS	83	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVCSCKAS	GUTFTGY YMH	WVRQAPGGGLEWWMG	WINPKSGDTNYA QKFGQ	RVTMTTRDTSTSTAYMELS RLRSDDTAVYYCAR	RLDV	WGQGTTVT VSS
sc 133 TMT/WDS	87	QVQLVQSGAEVKK PGASVKVCSCKAS	GUTFTGY YMH	WVRQAPGGGLEWWMG	WINPKSGDTNYA QKFGQ	RVTMTTRDTSTSTAYMELS RLRSDDTAVYYCAR	RLDV	WGQGTTVT VSS

Tabla 30. Secuencia de Aminoácidos de la Cadena Ligera de Anticuerpos ejemplares

Nombre de la cadena	No. SEQ ID:	FR1	RDC1	FR2	RDC2	FR3	RDC3	FR4
sc 264 RAD	77	SYELTOPSSVS PGQTARITC	SGDVLAK KSAR	WFHQKPGQAPLVLYI	KDSEKPS	RVTISVDTSKNQFSLKLS AVTAADTAVYYCAR	VATGRADYH FYAMDV	FGGKTKL VL
sc 264 RAD/ADY	97	SYELTOPSSVS PGQTARITC	SGDVLAK KSAR	WFHQKPGQAPLVLYI	KDSEKPS	RVTISVDTSKNQFSLKLS AVTAADTAVYYCAR	VATGRADYH FYAMDV	FGGKTKL VL
sc 188 SDM	73	EIVLTQSPGTLISL SPGERATLSC	RAGQTIS SRYLA	WYQQKPGQAPRPLIY	GASSRAT	GIPDRFSGSGGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYC	QQYSSPRT	FGQGTKVE IK
sc 133 TMT	81	QSVLTQPPSVSAA PGQKVTISC	SGSSNI GNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY	DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSATLG ITGLQTGDEADYYC	GTWNSSLA GYV	FGTGTKV VL
sc 133 WDS	85	QSVLTQPPSVSAA PGQKVTISC	SGSSNI GNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY	DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSATLG ITGLQTGDEADYYC	GTWNSSLA GYV	FGTGTKV VL
sc 133 TMT/WDS	89	QSVLTQPPSVSAA PGQKVTISC	SGSSNI GNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY	DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSATLG ITGLQTGDEADYYC	GTWNSSLA GYV	FGTGTKV VL

ES 2 746 925 T3

Listado de secuencias

<110> AstraZeneca AB

<120> Anticuerpos dirigidos hacia alfaVbeta6 y uso de los mismos

<130> ASTR-012/01WO

5 <150> US 60/835,559

<151> 2006-08-03

<160> 97

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

10 <211> 366

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tcgctggtgg ctccatcaga agtgggtgatt actactggag ctggatccgc      120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggtgatt gggaacatct attacagtgg gagcacctac      180
tacaaccogt ccctcaagag tcgaattacc atttcagtag ccacgtctag gaaccagttc      240
tcctgaagc tgacctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagaggg      300
ggagctatta cgatTTTTTgg agtgTTTgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc      360
tcctca                                          366
```

15 <210> 2

<211> 122

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ala Gly Gly Ser Ile Arg Ser Gly
          20          25          30

Asp Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
          35          40          45

Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
          50          55          60

Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Val Ala Thr Ser Arg Asn Gln Phe
20 65          70          75          80
```


ES 2 746 925 T3

<210> 5

<211> 366

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 5

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgtca tgagctgggt cgcgccaggct      120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggtgtg      300
gatacagcta tggttaccta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc      360
tcctca                                          366
    
```

<210> 6

<211> 122

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 6

```

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Gly Val Asp Thr Ala Met Val Thr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100           105           110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115           120
    
```

<210> 7

15 <211> 324

<212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 746 925 T3

<400> 7

```
tcctatgagc tgacacagcc accctcgggtg tcagtgtccc caggacaaac ggccaggatc      60
acctgctctg gagatgcatt gccaaaaaaa tatgcttatt ggtaccagca gaagtcaggc      120
caggcccctg tgctggatcat ctatgacgac agcaaacgac cctccgggat ccctgagaga      180
ttctctgggt ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtggggc ccaggtggag      240
gatgaagctg actactactg ttactcaaca gacagcagtg gtaatcatag ggtgttcggc      300
ggagggacca agctgaccgt ccta                                             324
```

<210> 8

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
          20          25          30

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

Asp Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50          55          60

Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
65          70          75          80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Asn His
          85          90          95

Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105
```

<210> 9

10 <211> 369

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> características_misc:

15 <222> (369)..(369)

<223> n e s a , c , g , o t

<400> 9

ES 2 746 925 T3

```

gaggtgcagc tggcgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc cgggggagtc tctgaagatc      60
tcctgtaagg gttctggata cagctttacc agctactgga tcggctgggt gcgccagatg      120
cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctg gtgactctga taccagatac      180
agcccgtcct tccaaggcca ggtcatcctc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac      240
ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacatgat      300
gaaagtagtg gttattacta tgtttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc      360
tcttcagcn                                     369

```

<210> 10

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

```

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20          25          30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85          90          95

Ala Arg His Asp Glu Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Val Phe Asp Ile Trp
100         105         110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
115         120

```

<210> 11

10 <211> 327

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> características_misc:

15 <222> (300)..(300)

<223> n e s c o t

<400> 11

ES 2 746 925 T3

```

tcctatgagc tgacacaacc accctcggcg tcagtgcccc caggacaaac ggccaggatc      60
acctgctctg gagatgcatt gccaaaaaaa tatgcttatt ggtaccagca gaagtcaaggc      120
caggcccctg ttctggatcat ctatgatgac atcaaacgac cctccgggat ccctgagaga      180
ttctctggct ccagctcagg gacaatggcc accttgacta tcagtggggc ccaggtggag      240
gatgaagctg actactactg ttactcaaca gacagcagtg gtaatcattg ggttttcttn      300
ggcggagggg ccaagctgac cgtccta                                          327

```

<210> 12

<211> 109

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 12

```

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
          20          25          30

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

Glu Asp Ile Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50          55          60

Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
65          70          75          80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Asn His
          85          90          95

Trp Val Phe Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100          105

```

<210> 13

10 <211> 339

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 13

```

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt ggcacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta aaagtgggtga cacaaactat      180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccctg accaggggaca cgtccaccag cacagcctac      240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaggttg      300
gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctca                                          339

```

ES 2 746 925 T3

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 14

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

Ser

<210> 15

<211> 330

<212> ADN

10 <213> Homo sapiens

<400> 15

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
 tctgtctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta ccagcagctc 120
 ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc aggaattcct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
 actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatggaata gcagcctgag tgctggttat 300
 gtcttcggaa ctgggaccaa ggtcaccgtc 330

<210> 16

<211> 110

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

ES 2 746 925 T3

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

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

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

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

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

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

5

<210> 21

<211> 372

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10

<400> 21

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgtt actactggac ctggatccgc 120
cagcaccagc ggaacggcct ggagtggatt ggctacatct attacagtgg gagcacctcc 180
tacaaccogt ccctcaagag togagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaacagttc 240
tcctgaacc tgacctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
ggaccactac ggggggacta ctactacggt ctggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
accgtctcct ca 372

<210> 22

<211> 124

<212> PRT

15

<213> Homo sapiens

<400> 22

ES 2 746 925 T3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Phe Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95

Ile Gln Leu Pro Trp Ala Phe Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 29

<211> 383

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 29

```
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
acctgcaactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120
cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt ggtacatct attacagtgg gagaacctac 180
aacaaccogt ccctcaagag togagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
tccctgaagt tgagttctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagtg 300
gctacgggga gaggggacta ccacttctac gctatggacg tctggggcca agggaccacg 360
gtcaccgtct cctcagcctc cac 383
```

<210> 30

<211> 125

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

ES 2 746 925 T3

```

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcatcc attagtatta gtagtagtta catatactac 180
gcagactcag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatccn 300
gtaccactgg aacgacgcga ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360
gtcaccgtct cctca 375

```

<210> 42

<211> 125

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 42

```

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Pro Val Pro Leu Glu Arg Arg Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met
          100          105          110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120          125

```

<210> 43

<211> 330

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 43

```

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcaatg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg tctcctggta ccagcagctc 120

```

ES 2 746 925 T3

```

ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct    180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag    240
actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag cgctggggta    300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta                                     330

```

<210> 44

<211> 110

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 44

```

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
          20          25          30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65          70          75          80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
          85          90          95

Ser Ala Gly Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
          100          105          110

```

<210> 45

<211> 375

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 45

```

caggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc    60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct    120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactac    180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat    240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaacggag    300
ggtatagcag ctcgtctcta ctactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg    360
gtcaccgtct cctca                                             375

```

15 <210> 46

ES 2 746 925 T3

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

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 Gly 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 Thr Glu Gly Ile Ala Ala Arg Leu Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

5 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 47

<211> 324

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 47

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tgacatccca 180
gacaggttc gtggcagtg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacctg gacgttcggc 300
caagggacca agtggaat caaa 324

<210> 48

<211> 108

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 48

ES 2 746 925 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 49

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 49

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 50

10 <211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 746 925 T3

<400> 50

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

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

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

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

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

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

<210> 51

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

ES 2 746 925 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Ile Ala Ala Ala Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

5 <210> 54

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

10

ES 2 746 925 T3

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Thr Ile Phe Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 55

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 55

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Val Ala Thr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

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

<210> 56

<211> 121

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

ES 2 746 925 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Leu Arg Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 57

<211> 120

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 57

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

ES 2 746 925 T3

<210> 58

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 58

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 59

<211> 123

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 59

ES 2 746 925 T3

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 60

<211> 112

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 60

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser
 85 90 95

Ile Gln Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 61

10 <211> 108

ES 2 746 925 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 62

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

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

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

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

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

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

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

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

<210> 63

10

ES 2 746 925 T3

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

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

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

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

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

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

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

5 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg
100 105

<210> 64

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 64

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val
100 105

ES 2 746 925 T3

<210> 65

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 65

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

Lys Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 66

<211> 108

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 66

ES 2 746 925 T3

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

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

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 67

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 67

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys Lys Tyr Ala
20 25 30

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

Glu Asp Ser Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Thr Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 68

10 <211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 746 925 T3

<400> 68

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

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

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Asn His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 69

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

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

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

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Tyr Ser Ala Ala Asp Asn Asn Val Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

10 <210> 70

<211> 372

<212> ADN

ES 2 746 925 T3

<213> Homo sapiens

<400> 70

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcaactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtgttt actactggac ctggatccgc 120
 cagcaccag ggaacggcct ggagtggatt ggctacatct attacagtgg gagcacctcc 180
 tacaaccgt cctcaagag togagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaacagttc 240
 tccctgaagc tgacctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagaa 300
 ggaccactac ggggggacta ctactacggt ctggacgtct ggggccaagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 71

5 <211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

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

10

<210> 72

<211> 324

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <400> 72

ES 2 746 925 T3

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccgggtca gactattagc agtcgctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggcc cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacctcg gacgttcggc      300
caagggacca aggtggaaat caaa                                             324

```

<210> 73

<211> 108

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 73

```

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 74

10 <211> 375

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 74

```

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctgggtg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc      120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagaacctac      180
aacaaccogt ccctcaagag togagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc      240
tccctgaagt tgagttctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagtg      300
gctacgggga gagcggacta ccacttctac gctatggacg tctggggcca agggaccacg      360
gtcaccgtct cctca                                                         375

```

ES 2 746 925 T3

<210> 75

<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 75

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30
 Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Asn Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Val Ala Thr Gly Arg Ala Asp Tyr His Phe Tyr Ala Met
 100 105 110
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 76

<211> 318

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 76

tcctatgagc tgacacagcc atcctcagtg tcagtgtctc cgggacagac agccaggatc 60
 acctgctcag gagatgtact ggcaaaaaag tctgctcggg ggttcacca gaagccaggc 120
 caggcccctg tactgggtgat ttataaagac agtgagcggc cctcagggat ccctgagcgc 180
 ttctccggct ccagctcagg gaccacagtc acctgacca tcagcggggc ccaggttgag 240
 gatgaggctg cctattactg ttactctgcg gctgacaaca atctggtatt cggcggaggg 300
 accaagctga ccgtccta 318

<210> 77

15 <211> 106

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

ES 2 746 925 T3

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

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

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

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 78

<211> 339

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 78

```
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta aaagtgggtga cacaaactat 180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccaccag cacagcctac 240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaaggttg 300
gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc gtctcctca 339
```

<210> 79

<211> 113

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

ES 2 746 925 T3

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

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

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
 65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 94

<211> 375

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 94

```
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc      120
cagcaccagc ggaagggcct ggagtggtatt gggtagatct attacagtgg gagaacctac      180
aacaaccogt ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc      240
tcctgaagt  tgagtctgt  gactgccgcg  gacacggccg  tgtattactg  tgcgagagtg      300
gctacgggga gagcggacta ccacttctac gctatggagc tctggggcca agggaccacg      360
gtcacctctc cctca                                           375
```

<210> 95

<211> 125

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly
 20 25 30

ES 2 746 925 T3

Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Thr Tyr Asn Asn Pro Ser
 50 55 60

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

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

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

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 96

<211> 318

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 96

```

tcctatgagc tgacacagcc atcctcagtg tcagtgtctc cgggacagac agccaggatc      60
acctgctcag gagatgtact ggcaaaaaag tctgctcggg ggttccacca gaagccaggc      120
caggcccttg tactgggtgat ttataaaagac agtgagcggc cctcagggat ccctgagcgc      180
ttctccggct ccagctcagg gaccacagtc accttgacca tcagcggggc ccaggttgag      240
gatgaggctg actattactg ttactctgcg gctgacaaca atctggtatt cggcggaggg      300
accaagctga cgcctcta                                     318
    
```

<210> 97

<211> 106

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

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

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

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

ES 2 746 925 T3

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Val Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, en el que el anticuerpo se une específicamente a la integrina $\alpha V\beta 6$, comprendiendo el anticuerpo:
- 5 (i) una secuencia RDC3 de la región variable de la cadena pesada que comprende a la secuencia de aminoácidos VATGRADYHFYAMDV;
- (ii) una secuencia RDC2 de la región variable de la cadena pesada que comprende a la secuencia de aminoácidos YIYYSGRTYNNPSLKS;
- (iii) una secuencia RDC1 de la región variable de la cadena pesada que comprende a la secuencia de aminoácidos GGSISSGGYYWS;
- 10 (iv) una secuencia RDC3 de la región variable de la cadena ligera que comprende a la secuencia de aminoácidos YSAADNNLV;
- (v) una secuencia RDC2 de la región variable de la cadena ligera que comprende a la secuencia de aminoácidos KDSERPS;
- 15 (vi) una secuencia RDC1 de la región variable de la cadena ligera que comprende a la secuencia de aminoácidos SGDVLAKKSAR.
2. El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos definida por SEQ ID NO. 75, y/o el polipéptido de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO. 77.
3. El anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo tiene una o más de las siguientes propiedades:
- 20 inhibe la unión de ligandos a $\alpha V\beta 6$;
- inhibe más del 99% de la adhesión mediada por TGF β -LAP de células HT29;
- inhibe la adhesión mediada por TGF β -LAP de células HT29 con una IC₅₀ de menos que 0.070 $\mu\text{g/ml}$; y se une a $\alpha V\beta 6$ con una Kd de menos que 35 nanomolar (nM).
- 25 4. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal completamente humano.
5. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fragmento de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en: Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb , y anticuerpos de cadena sencilla (scFv o scFv₂).
- 30 6. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un acarreador farmacéuticamente aceptable.
7. Una molécula de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
8. Un vector que comprende a la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 7.
- 35 9. Una célula huésped que comprende a el vector de la reivindicación 8.
10. Un método para producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende cultivar a la célula huésped de la reivindicación 9 en condiciones apropiadas y recuperar dicho anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.
- 40 11. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5 o una composición según la reivindicación 6 para el uso en el tratamiento de un tumor maligno.
- 45 12. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la reivindicación 11, en el que dicho tumor maligno se selecciona del grupo que consiste en: melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), tumor de tiroides, cáncer gástrico (estómago), cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer pancreático, carcinoma de esófago, cánceres de cabeza y cuello, mesotelioma, sarcomas, colangiocarcinoma, adenocarcinoma del intestino delgado, neoplasias pediátricas y carcinoma epidermoide.

13. Un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5 o una composición según la reivindicación 6 para el uso en el tratamiento de la inflamación.

5 14. Uso de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5 o de una composición de acuerdo con la reivindicación 6 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor maligno, opcionalmente en el que se selecciona el tumor maligno del grupo que
10 consiste en: melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, carcinoma hepatocelular (hígado), tumor tiroideo, cáncer gástrico (estómago), cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de páncreas, carcinoma de esófago, cánceres de cabeza y cuello, mesotelioma, sarcomas, colangiocarcinoma, adenocarcinoma de intestino delgado, tumores malignos pediátricos y carcinoma epidermoide.

15. Uso de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a la 5 o de una composición según la reivindicación 6 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la inflamación.

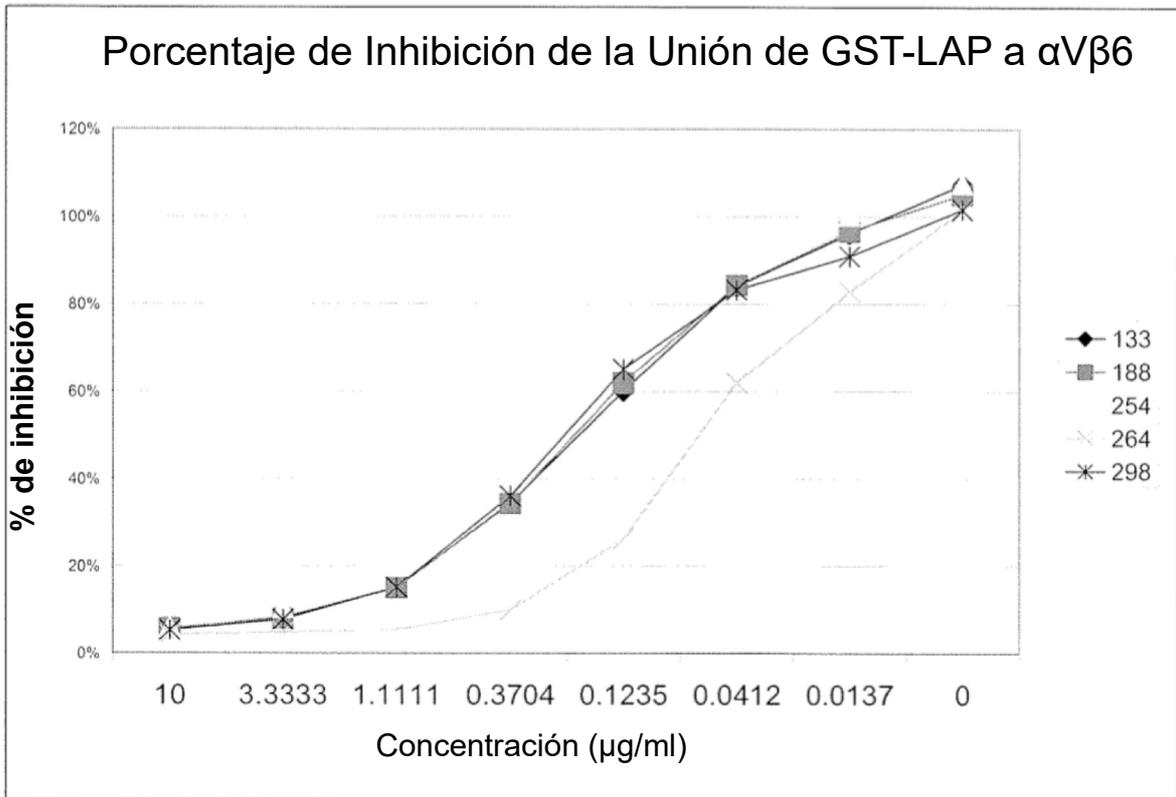


Figura 1

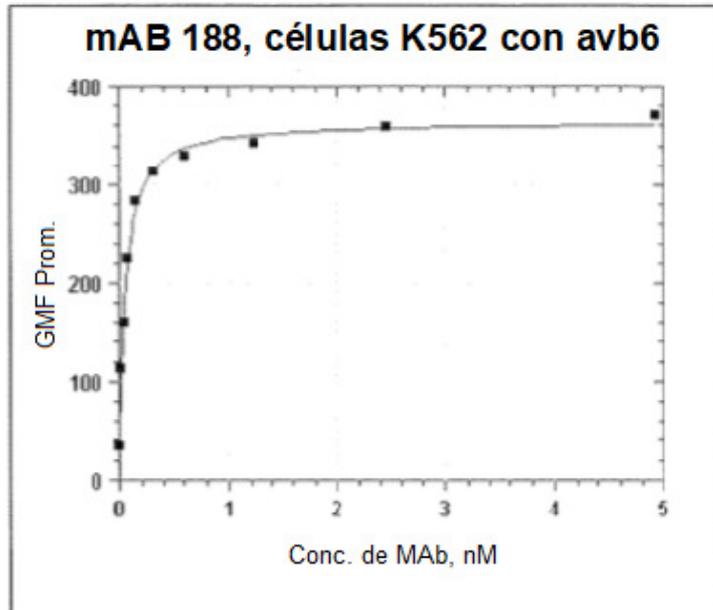


Figura 2A

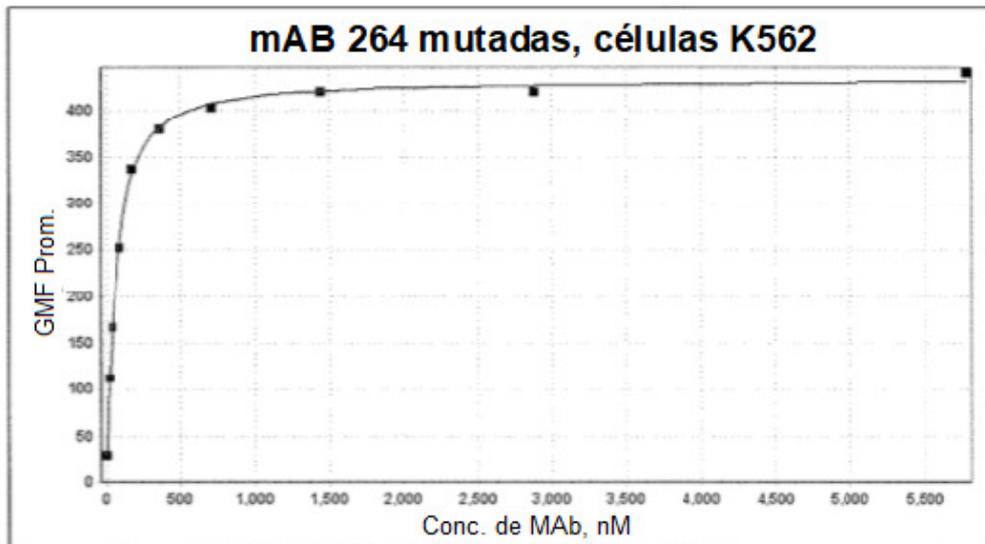


Figura 2B

CDC- AlfaV beta6 mAb133

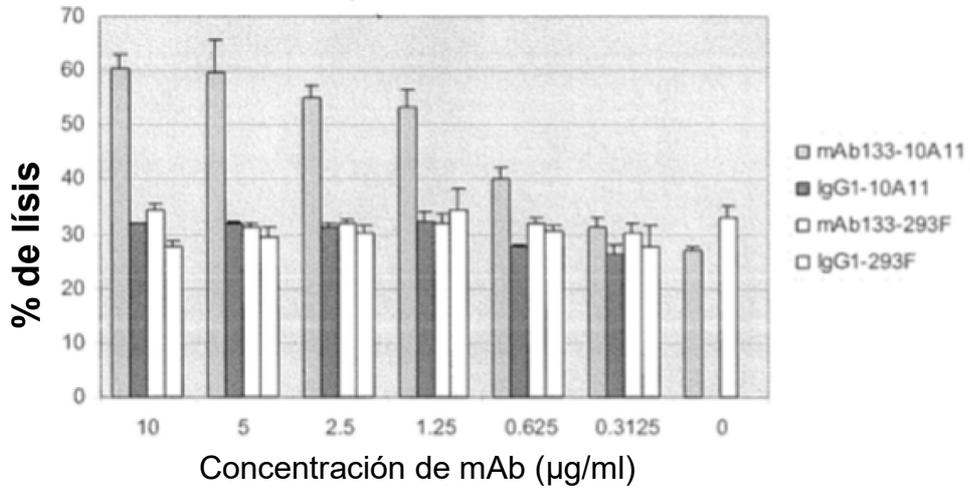


Figura 3A

CDC- AlfaV beta6 mAb188

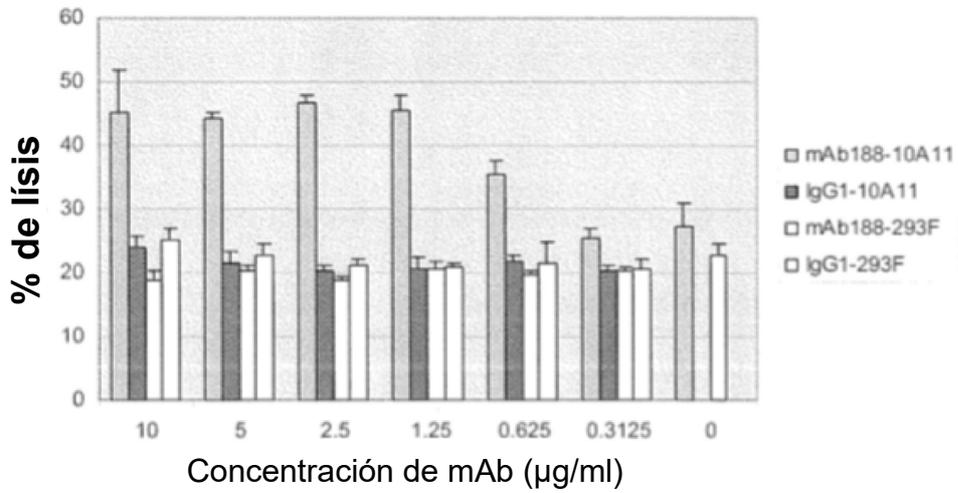


Figura 3B

CDC- AlfaV beta6 mAb254.2

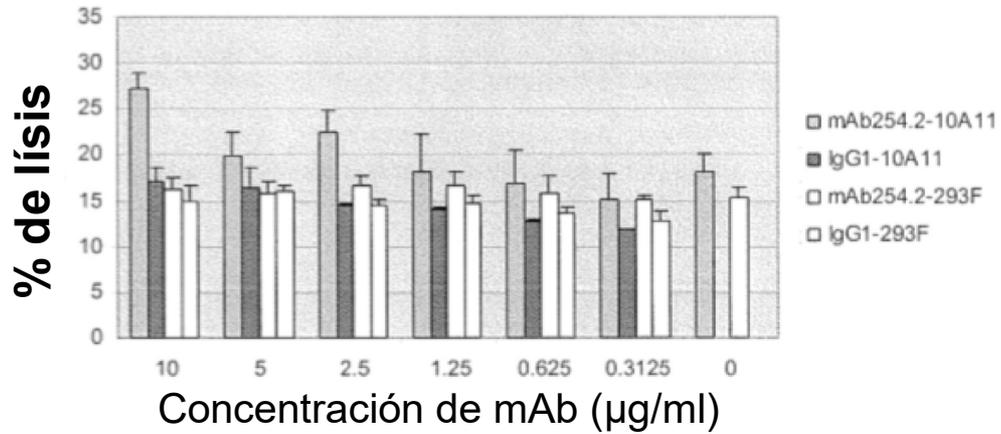


Figura 3C

CDC- AlfaV beta6 mAb264

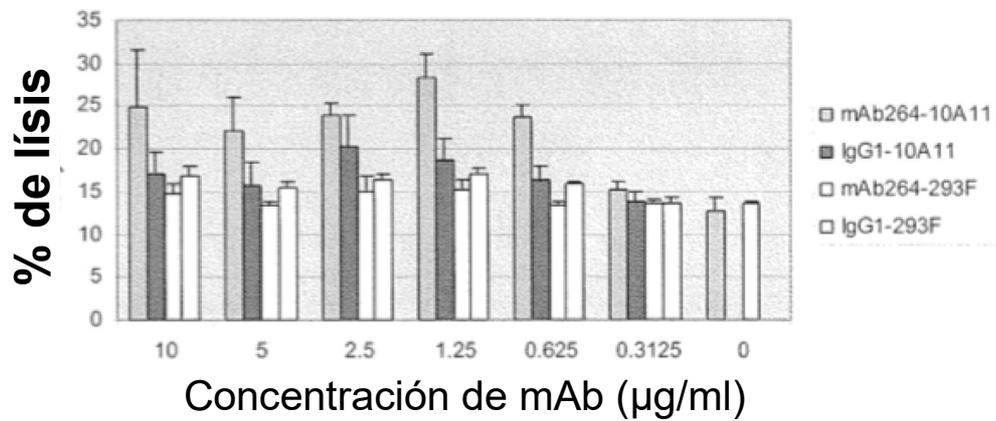


Figura 3D

CDC- AlfaV beta6 mAb298

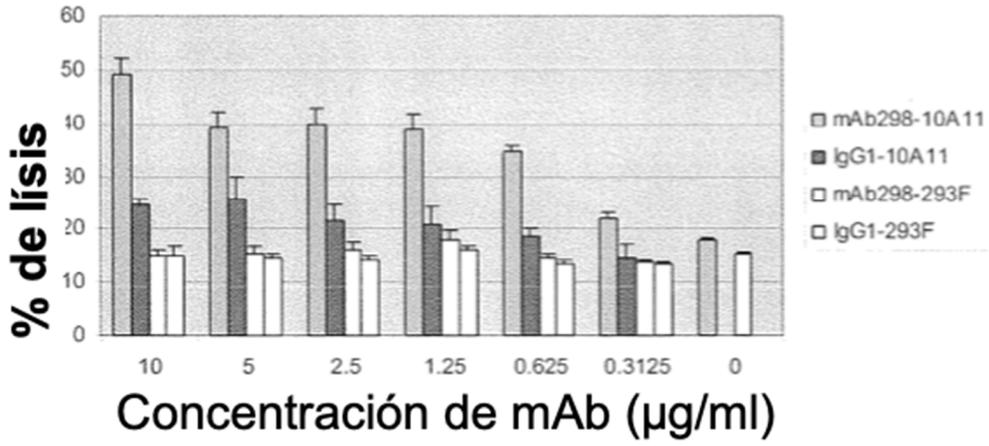


Figura 3E

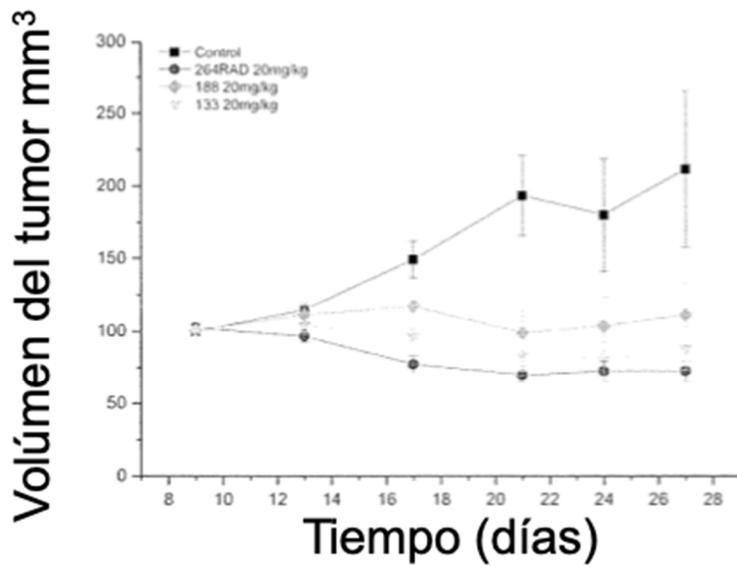


Figura 4

Ensayo de adhesión celular utilizando células Detroit562 con 2mM de MgCl₂

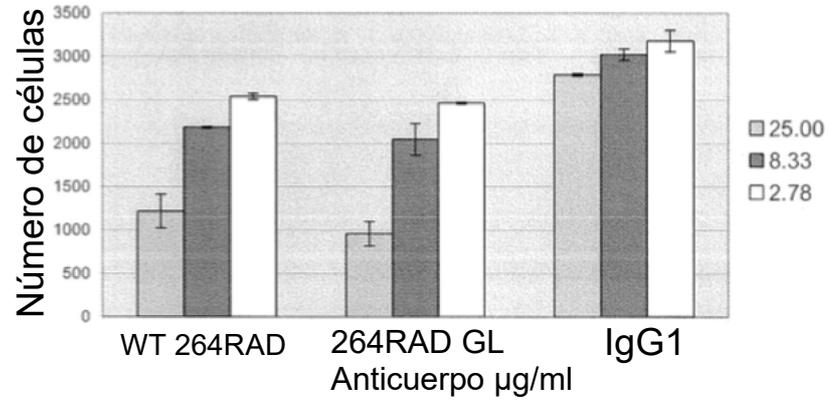


Figura 5