

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 833**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68	(2007.01) G01N 33/574	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01) C07H 21/04	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01) C12N 15/09	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01) C12N 15/63	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01) A61P 31/04	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)	
A61K 45/06	(2006.01)	
A61K 49/16	(2006.01)	
C07K 14/725	(2006.01)	
C07K 16/30	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2014** **PCT/US2014/060299**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2015** **WO15054691**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2014** **E 14789480 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019** **EP 3054987**

54 Título: **Anticuerpos contra TEM8 y su uso**

30 Prioridad:

11.10.2013 US 201361889958 P

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

04.06.2020

73 Titular/es:

**THE UNITED STATES OF AMERICA,
REPRESENTED BY THE SECRETARY,
DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN
SERVICES (50.0%)
Office of Technology Transfer National Institutes
of Health 6011 Executive Boulevard Suite 325,
MSC 7660
Bethesda, Maryland 20892-7660, US y
BIOMED VALLEY DISCOVERIES, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DIMITROV, DIMITER;
ZHU, ZHONGYU;
ST. CROIX, BRAD;
ZUDAIRE, ENRIQUE;
SAHA, SAURABH;
ZHANG, XIAOYAN, MICHELLE;
DECRESCENZO, GARY y
WELSCH, DEAN**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

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

ES 2 764 833 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 contra TEM8 y su uso

5 Campo de la divulgación

La presente solicitud se refiere al campo del cáncer, en particular a anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y conjugados, que se unen específicamente a TEM8 y a su uso.

10 Antecedentes

La angiogénesis, el proceso de desarrollar una red hemovascular a partir de vasos sanguíneos preexistentes, es esencial para el crecimiento de tumores sólidos y es un componente de los procesos normales de curación de heridas y crecimiento. También se ha implicado en la fisiopatología de muchas enfermedades y afecciones, incluyendo la aterogénesis, la artritis, la psoriasis, la neovascularización corneal y la retinopatía diabética. Los factores de angiogénesis desempeñan una función importante en el desarrollo de neoplasias malignas.

El marcador endotelial tumoral 8 (TEM8), también conocido como Receptor 1 de la toxina antrácica (ANTXR1), es una glucoproteína de superficie celular, de un solo paso, identificada originariamente, junto con una serie de otros marcadores endoteliales tumorales no relacionados, basándose en su sobreexpresión en las células endoteliales que revisten la vasculatura tumoral del cáncer colorrectal humano. TEM8 también actúa como un receptor de la superficie celular para la toxina antrácica y comparte una identidad de aminoácidos del 58 % con CMG2 (también conocido como ANTXR2), un segundo receptor para la proteína de la toxina antrácica. A diferencia del VEGF, los VEGFR y muchos otros reguladores clave de la angiogénesis, TEM8 no es necesario para la angiogénesis del desarrollo, la cicatrización de heridas o la angiogénesis fisiológica normal del cuerpo lúteo. TEM8 está regulado positivamente en los vasos tumorales de diversos tipos de tumores tanto en ratones como en seres humanos, y, en algunos tumores, también es expresado por las células tumorales. Existe la necesidad de agentes quimioterápicos que se dirijan a TEM8 y de anticuerpos de alta afinidad que se unan específicamente a TEM8 en la superficie celular.

<El documento WO 2012/174160 desvela anticuerpos anti-TEM8 humanos.>

Sumario

La invención se define en las reivindicaciones.

Se proporcionan anticuerpos neutralizantes monoclonales humanos aislados que se unen específicamente a TEM8 en la superficie celular, fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos, conjugados de los mismos, linfocitos T receptores de antígeno quimérico (CAR) que expresan un CAR que incluye un dominio extracelular que incluye un anticuerpo desvelado o un fragmento de unión a antígeno del mismo y procedimientos de uso de estas moléculas. En algunas realizaciones, los conjugados incluyen una molécula efectora o marcador detectable unido covalentemente a un anticuerpo monoclonal, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a TEM8. En algunas realizaciones, los anticuerpos o conjugados se usan en procedimientos para la detección de una célula endotelial de un sujeto que expresa TEM8. En algunas realizaciones, la detección de una célula endotelial de un sujeto que expresa TEM8 detecta angiogénesis patológica en un sujeto. En otras realizaciones, los anticuerpos y conjugados son para su uso en procedimientos de detección y/o tratamiento de un tumor, por ejemplo, un carcinoma. En otras realizaciones más, los anticuerpos y conjugados son para su uso en procedimientos de disminución de la unión del antígeno protector antrácico (PA) a una célula.

Se entenderá que los anticuerpos, los conjugados y los linfocitos T CAR y los procedimientos de su uso son útiles más allá de las circunstancias específicas que se describen en detalle en el presente documento. Por ejemplo, se espera que los procedimientos sean útiles para una diversidad de situaciones, por ejemplo, para detectar una célula endotelial que expresa TEM8 en un sujeto, tratar un tumor en un sujeto o para disminuir la unión de PA antrácico a una célula.

Lo anterior y las características y ventajas de la divulgación se harán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, que procede con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de las figuras

Las FIG. 1A y 1B son una serie de gráficos que ilustran los resultados de ensayos de citometría de flujo de la unión de los anticuerpos contra TEM8 humanos m825, m822, m830 y m863 a células que expresan TEM8 o CMG2. CMG2 es el homólogo humano más cercano de TEM8.

La FIG. 2 muestra una serie de imágenes digitales que ilustran la tinción inmunofluorescente de vasos tumorales usando el anticuerpo m825 en un formato de IgG1 humana. Se inocularon ratones de tipo silvestre (WT, por sus siglas en inglés) e inactivados para TEM8 (TEM8 KO, por sus siglas en inglés) con células de cáncer de colon

DLD-1 por vía subcutánea. Después de la formación del tumor de xenoinjerto, se obtuvo una muestra del tumor y se tiñó con anticuerpo CD31 (específico para vasos sanguíneos) y el anticuerpo m825 (específico para TEM8). El anticuerpo m825 tiñó los vasos tumorales DLD-1 mediante inmunofluorescencia.

La **FIG. 3** es un gráfico que ilustra la inhibición del crecimiento de xenoinjertos de células de melanoma UACC por el anticuerpo m825 en ratones atímicos desnudos. Se inocularon ratones con células de melanoma UACC por vía subcutánea y se administraron anticuerpos m825, IgG de control o vehículo de control a los ratones a una dosis de 20 o 40 mg/kg en cada uno de los días indicados por una flecha en el gráfico.

La **FIG. 4** es un gráfico que ilustra que el anticuerpo m825 inhibe el crecimiento de xenoinjertos de células de cáncer de colon HCT116 cultivados por vía subcutánea en ratones atímicos desnudos. Se inocularon ratones con células de cáncer de colon HCT116 por vía subcutánea y se administraron anticuerpos m825, IgG de control o vehículo de control a los ratones a una dosis de 15 mg/kg en cada uno de los días indicados por una flecha en el gráfico.

La **FIG. 5** es un gráfico que ilustra la inhibición del crecimiento de xenoinjertos de células de melanoma UACC cultivados por vía subcutánea en ratones atímicos desnudos por anticuerpos anti-TEM8. Se inocularon ratones con células de melanoma UACC por vía subcutánea y se administraron anticuerpos m825, m822, m830 y m863 en formato IgG1 completamente humana tres veces por semana a los ratones a una dosis de 15 mg/kg.

Las **FIG. 6A y 6B** son un conjunto de imágenes digitales y un gráfico que ilustra que el tratamiento con el anticuerpo m830 inhibe la metástasis del cáncer de colon en el hígado en un modelo animal. La **FIG. 6A** muestra imágenes de bioluminiscencia de ratones atímicos desnudos a los que se les inyectó inyección intraesplénica de células de cáncer de colon humano. La señal de bioluminiscencia se cuantificó (**FIG. 6B**).

La **FIG. 7** es un gráfico que ilustra la unión de un conjugado anticuerpo-fármaco que incluía el anticuerpo m825 completamente humano conjugado con la toxina MMAE a TEM8 recombinante (AP-TEM8) así como a células CHO que sobreexpresaban TEM8 (CHO TEM8). Las células CHO que no expresan TEM8 (CHO) se usaron como control negativo.

La **FIG. 8** es un gráfico que ilustra que un conjugado fármaco-anticuerpo que incluye el anticuerpo m825 completamente humano conjugado con la toxina MMAE es selectivamente citotóxico hacia células que expresan TEM8. Se trataron células HEK 293 (293) o células HEK 293 transfectadas con TEM8 (293/TEM8) con MMAE sola (MMAE), m825 solo (anti-TEM8) o un conjugado anticuerpo-fármaco que incluía el anticuerpo m825 totalmente humano conjugado con MMAE (anti-TEM8-MMAE). La toxina MMAE era citotóxica hacia las células 293 y 293/TEM8, mientras que el conjugado anticuerpo-fármaco era citotóxico selectivamente hacia las células 293/TEM8.

La **FIG. 9** es un gráfico que ilustra la regresión de xenoinjertos de cáncer de colon humano después del tratamiento con un conjugado anticuerpo-fármaco que incluía el anticuerpo m825 completamente humano conjugado con MMAE (m825-MMAE). Se cultivaron xenoinjertos de cáncer de colon (células HCT116) por vía subcutánea en ratones atímicos desnudos. Se administró a los ratones la cantidad indicada (mg/kg, mpk) de vehículo, anticuerpo m825 solo (M825) o m825-MMAE, dos veces por semana durante tres semanas.

La **FIG. 10** es un gráfico que ilustra la regresión de xenoinjertos de cáncer de ovario humano después del tratamiento con un conjugado anticuerpo-fármaco que incluía el anticuerpo m825 completamente humano conjugado con MMAE. Se cultivaron xenoinjertos de cáncer de ovario (células OVCAR3) por vía subcutánea en ratones atímicos desnudos. Se administró a los ratones la cantidad indicada (mg/kg, mpk) de vehículo, anticuerpo m825 solo (M825), MMAE sola o m825-MMAE dos veces por semana durante tres semanas y media.

LISTADO DE SECUENCIAS

Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando abreviaturas de letras convencionales para bases nucleotídicas y un código de tres letras para aminoácidos, como se define en 37 C.F.R. 1.822. Solo se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero la cadena complementaria se entiende incluida por cualquier referencia a la cadena que se muestra. El Listado de Secuencias se remite como un archivo de texto ASCII en forma del archivo llamado "Sequence.txt" (~28 kb), que se creó el 1 de octubre de 2014. En el listado de secuencias adjunto:

La **SEQ ID NO: 1** es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del mAb **m825**.

```
QVQLVQSGAEVKKPGTSPVKVSKVPGYTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTTNYAQKFQGRVTIT
GEESTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARDTDYMFYWGQGLTVTVSS
```

La **SEQ ID NO: 2** es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del mAb **m825**.

```
SSELTQDPVVSVALGETVSI TCQGDNL RDFYASWYQKPGQAPLLVMYGKNRRPSGIPDRFSGSTSGNTLS
LTITGAQAEDEADYYC SSRD NSKHVVFGGGTKVTVL
```

La **SEQ ID NO: 3** es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del mAb **m822**.

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTIT
ADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDTDYMFYWCQGT LVTVSS

La **SEQ ID NO: 4** es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del mAb **m822**.

SSELTQDPVVSVALGETVSITCQGDNL RDFYASWYQ QKPGQAPLLVMYGKNRRPSGIPDRFSGSTSGNTLS
LTITGAQAEDEADYYCSSRDNSKHVVF GGGTKVTVL

La **SEQ ID NO: 5** es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del mAb **m830**.

EVQLVESGGGVVQPGRSVRLSCAASGFTFSTYTMHWVRQAPGKGLEWVAIISNDGSNKYYADPVRGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRGSSWYRGNWFD PWGQGT LVTVSS

La **SEQ ID NO: 6** es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del mAb **m830**.

DIQMTQSPSSLSASVGDRTIACRASQTISR YLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVSSRFSGSGSGTEF
TLTISSLQPEDFATYFCQQTYSPPITFGQ GTRLEIKR

La **SEQ ID NO: 7** es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del mAb **m863**.

EVQLVETGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPTSGSTNYAQKFQGRVTMT
RDTISISTAYMELSGLRSDDTAVYYCVRDPGSPKWLAFDPWGQGT LVTVSS

La **SEQ ID NO: 8** es la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del mAb **m863**.

DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASRAISR YLNWYQ QKPGKAPKLLIYAASSLQSGVSSRFSGSGSGTEF
TLTISSLQPEDFATYFCQQTYSPPITFGQ GTRLEIKR

La **SEQ ID NO: 9** es una secuencia de ADNc de ejemplo que codifica la proteína TEM8 humana (N.º de acceso de GENBANK® NM_032208.2 como estaba presente en la base de datos el 10 de septiembre de 2013).

La **SEQ ID NO: 10** es la secuencia proteínica de TEM8 humano (N.º de acceso de GENBANK® NP_115584.1 como estaba presente en la base de datos el 10 de septiembre de 2013).

La **SEQ ID NO: 11** es una secuencia de ADNc de ejemplo que codifica la región variable de la cadena pesada del mAb **m825**.

cagggtccagctggtgcagtcctggtgggctgaggtgaagaagcctgggacctcagtgaaggtctcctgcaaggt
tcttgatacaccttcagcagctatgctatcagctgggtgcgacaggccctggacaagggcttgagtgga
tgggaggggatcatccctatctttggtacaacaaactacgcacagaagttccagggcagagtcacgattacc
ggggaggaatccacgagcagctctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggccgtgtatta
ctgtgcgagagatacggactacatgtttgactactggggccagggaaacctggtcacctgtgagctca

La **SEQ ID NO: 12** es una secuencia de ADNc de ejemplo que codifica la región variable de la cadena ligera del mAb **m825**.

Tcttctgagctgactcaggaccctgttgtgtctgtggccttgggagagacagtcagtatcacatgccaaagg
agacaacctcagagacttttatgcaagctggtaccaacagaagccaggacaggccccctctactagtcattgt
atggtaaaaacaggcgccctcagggatccagaccgattctctggctccacctcaggaaacacactt

tccttgaccatcactggggctcaggcggaagatgaggctgactattactgtagctcccgggacaacagta
agcatgtggtgttcggcggggggaccaagggtcacctgcta

La **SEQ ID NO: 13** es una secuencia de ADNc de ejemplo que codifica la región variable de la cadena pesada del mAb **m822**.

5

caggctccagctggtgcagctctggggctgagggtgaagaagcctggggcctcagtgaagggtctcctgcaagg
tttctggatacaccttcagcagctatgctatcagctgggtgcgacaggccccctggacaagggcttgagtg
gatgggagggatcatccctatcttgggtacagcaaaactacgcacagaagttccagggcagagtcacgatt
accgoggacgaatccacgagcacagcctacatggagctgagcagcctgagatctgaggacacggcctgtgt
attactgtgcgagagatacggactacatgtttgactactggggccagggaacctgtgtcacctgagctc
a

La **SEQ ID NO: 14** es una secuencia de ADNc de ejemplo que codifica la región variable de la cadena ligera del mAb **m822**.

10

tcttctgagctgactcaggaccctgttgtgtctgtggccttgggagagacagtcagtatcacatgccaaag
gagacaacctcagagacttttatgcaagctggtaccaacagaagccaggacaggccccctctactagtcatt
gtatggtaaaaacaggcgccctcagggatccagaccgattctctggctccacctcaggaaacacactt
tccttgaccatcactggggctcaggcggaagatgaggctgactattactgtagctcccgggacaacagta
agcatgtggtgttcggcggggggaccaagggtcacctgcta

La **SEQ ID NO: 15** es una secuencia de ADNc de ejemplo que codifica la región variable de la cadena pesada del mAb **m830**.

15

gagggtgcagctggtggagctctgggggaggcgtggtccagcctgggagggtccgtgagactctcctgtgcag
cctctggattcaccttcagtacctatactatgcactgggtccgccaggctccaggcaaggggctggagtg
ggtggcaattatctcaaagatggaagcaataagtactacgcagacccccgtgaggggcccattcaccatc
tcagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagctgaggacacggctgtgt
attactgtgtacgtggcagcagctggtatcgcggaattgggttcgaccctggggccagggaacctgtgt
cacctgagctca

La **SEQ ID NO: 16** es una secuencia de ADNc de ejemplo que codifica la región variable de la cadena ligera del mAb **m830**.

20

gacatccagatgacccagtcctccatcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcgcttgcc
 gggcaagtgcagaccattagtaggtatttaaattggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcct
 gatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtctcatcaagggttcagtggcagtggtatctgggacagag
 ttcaactctcaccatcagcagctctgcagcctgaagattttgcaacttatttctgtcaacagacttacagtc
 ccccgatcaccttcggccaagggacacgactggagattaaacga

La **SEQ ID NO: 17** es una secuencia de ADNc de ejemplo que codifica la región variable de la cadena pesada del mAb **m863**.

5

gaggtgcagctggtggagaccggggctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaaggtctcctgcaagg
 cttctggatacaccttcaccggctactatatgcaactgggtgcgacaggccctggacaagggcttgagtg
 gatgggatggatcaacctaccagtggttagcacaactatgcacagaagtttcagggcagggtcaccatg
 accagggacacgtccatcagcacagcctacatggagctgagcgggctgagatctgacgacactgccgtgt
 attactgtgtgagagatccgggttctcctaagtggctggccttcgacccctggggccagggcacccctggt
 caccgtgagctca

La **SEQ ID NO: 18** es una secuencia de ADNc de ejemplo que codifica la región variable de la cadena ligera del mAb **m863**.

10

gacatccagttgacccagtcctccatcctccttgtctgcttctgtaggagacagagtcaccatcacttgcc
 gggcaagtgcggccattagtaggtatttaaattggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcct
 gatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtctcatcaagggttcagtggcagtggtatctgggacagag
 ttcaactctcaccatcagcagctctgcagcctgaagattttgcaacttatttctgtcaacagacttacagtc
 ccccgatcaccttcggccaagggacacgactggagattaaacgt

Descripción detallada

15 I. Sumario de términos

A menos que se indique otra cosa, los términos técnicos se usan de acuerdo con su uso convencional. Pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en Benjamin Lewin, *Genes VII*, publicado por Oxford University Press, 1999; Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994; y Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995; y otras referencias similares.

Como se usan en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" se refieren tanto al singular como al plural, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, la expresión "un antígeno" incluye antígenos simples o plurales y puede considerarse equivalente a la frase "al menos un antígeno". Como se usa en el presente documento, el término "comprende" significa "incluye". Por tanto, "que comprende un antígeno" significa "que incluye un antígeno" sin excluir otros elementos. La frase "y/o" significa "y" u "o". Ha de entenderse además que cualquiera y todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, proporcionados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados y se proporcionan con fines descriptivos, a menos que se indique otra cosa. Aunque pueden usarse muchos procedimientos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados particulares. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las explicaciones de términos, prevalecerá. Además, los materiales, procedimientos y ejemplos son solamente ilustrativos y no tienen por objeto ser limitantes. Para facilitar la revisión de las diversas realizaciones se proporcionan las siguientes explicaciones de términos:

Administración: Proporcionar o dar a un sujeto un agente, por ejemplo, una composición que incluye un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a TEM8, tal como un conjugado, mediante cualquier vía eficaz. Las vías de

administración de ejemplo incluyen, pero sin limitación, la vía oral, inyección (tal como subcutánea, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal e intravenosa), sublingual, rectal, transdérmica (por ejemplo, tópica), intranasal, vaginal e inhalatoria.

- 5 **Agente:** Cualquier sustancia o cualquier combinación de sustancias que sea útil para conseguir un fin o resultado; por ejemplo, una sustancia o combinación de sustancias útiles para disminuir o reducir la angiogénesis patológica en un sujeto. Los agentes incluyen moléculas efectoras y marcadores detectables. En algunas realizaciones, el agente es un marcador detectable, agente quimioterápico, toxina o agente antiangiogénico. El experto en la materia comprenderá que agentes particulares pueden ser útiles para conseguir más de un resultado; por ejemplo, un
- 10 agente puede ser útil como marcador detectable y como agente antiangiogénico.

Angiogénesis: Un proceso biológico que conduce a la generación de nuevos vasos sanguíneos a través del brote o el crecimiento de vasos sanguíneos preexistentes. El proceso implica la migración y proliferación de células endoteliales de vasos preexistentes. La angiogénesis se produce durante el desarrollo pre y postnatal y en el adulto.

15 La angiogénesis se produce durante el ciclo normal del sistema reproductivo femenino, la curación de heridas y durante procesos patológicos tales como el cáncer, donde es esencial para el crecimiento de tumores sólidos (para una revisión, véase Battegay, *J. Molec. Med.*, 73 (7): 333-346, 1995; Shchors y Evan, *Cancer Res.*, 67: 1630-1633. 2007).

20 **Ántrax:** Una enfermedad aguda provocada por la bacteria *Bacillus anthracis* y, en particular, por la toxina que produce. La toxina antrácica es una mezcla de tres componentes proteínicos: (i) antígeno protector (PA), (ii) factor de edema (EF) y (Hi) factor letal (LF). La entrada celular de la toxina antrácica requiere la unión de PA a uno de sus dos receptores de superficie celular, ANT XR1 (también conocido como TEM8) o ANT XR2 (también conocido como receptor CMG2), en la célula hospedadora (véase, por ejemplo, Van der Goot y Young, *Mol. Aspects Med.*, 30 (6): 406-412, 2009; Moayeri y Leppla, *Curr Opin Microbiol* 7 (1): 19-24, 2004).

25

Antígeno protector antrácico (PA): La proteína secretada por *Bacillus anthracis* que forma la toxina antrácica con factor de edema (EF) y factor letal (LF). La entrada celular de la toxina antrácica requiere la unión de PA a uno de sus dos receptores de superficie celular, ANT XR1 (también conocido como TEM8) o ANT XR2 (también conocido como receptor CMG2), en la célula hospedadora (véase, por ejemplo, Van der Goot y Young, *Mol. Aspects Med.*, 30 (6): 406-412, 2009; Moayeri y Leppla, *Curr Opin Microbiol* 7 (1): 19-24, 2004). Después de la escisión por proteasa, el PA se une a las dos enzimas tóxicas (EF y LF) y media su transporte al citosol, donde ejercen sus efectos patógenos (Bradley et al., *Nature* 414: 225, 2001). El remanente de PA de 63 kD escindido más pequeño (PA₆₃) se oligomeriza, exponiendo un segundo dominio de unión y se une a EF, una proteína de 89 kD, para formar toxina de edema, o LF, una proteína de 90 kD, para formar toxina letal (LeTx) (Leppla et al., *Salisbury Med. Bull. Suppl.* 68: 41-43, 1990) y el complejo se internaliza en la célula donde ingresa en el sistema endosómico (Singh et al., *Infect. Immun.* 67: 1853, 1999; Friedlander, *J. Biol. Chem.* 261: 7123, 1986). Desde estos endosomas, el canal de PA₆₃ permite la translocación de LF y EF al citosol mediante un mecanismo dependiente del pH y el voltaje (Zhao et al., *J. Biol. Chem.*, 270: 18626, 1995). En algunas realizaciones, los anticuerpos o conjugados específicos de TEM8

30 (6): 406-412, 2009; Moayeri y Leppla, *Curr Opin Microbiol* 7 (1): 19-24, 2004). Después de la escisión por proteasa, el PA se une a las dos enzimas tóxicas (EF y LF) y media su transporte al citosol, donde ejercen sus efectos patógenos (Bradley et al., *Nature* 414: 225, 2001). El remanente de PA de 63 kD escindido más pequeño (PA₆₃) se oligomeriza, exponiendo un segundo dominio de unión y se une a EF, una proteína de 89 kD, para formar toxina de edema, o LF, una proteína de 90 kD, para formar toxina letal (LeTx) (Leppla et al., *Salisbury Med. Bull. Suppl.* 68: 41-43, 1990) y el complejo se internaliza en la célula donde ingresa en el sistema endosómico (Singh et al., *Infect. Immun.* 67: 1853, 1999; Friedlander, *J. Biol. Chem.* 261: 7123, 1986). Desde estos endosomas, el canal de PA₆₃ permite la translocación de LF y EF al citosol mediante un mecanismo dependiente del pH y el voltaje (Zhao et al., *J. Biol. Chem.*, 270: 18626, 1995). En algunas realizaciones, los anticuerpos o conjugados específicos de TEM8

35 incluyendo los anticuerpos específicos de TEM8 que se desvelan en el presente documento son capaces de bloquear la unión de PA a TEM8. En un ejemplo, PA incluye una secuencia de aminoácidos expuesta en N.º de acceso de GENBANK® AAF86457, al que se accedió el 19 de septiembre de 2013.

40

Agente antiangiogénico: Una molécula que disminuye o reduce la angiogénesis, por ejemplo, una molécula que disminuye la angiogénesis patológica. En algunos ejemplos, los anticuerpos que se unen específicamente a TEM8 o conjugados que incluyen dichos anticuerpos son agentes antiangiogénicos que disminuyen la angiogénesis patológica. Los agentes antiangiogénicos adicionales incluyen, pero sin limitación, anticuerpos contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (por ejemplo, bevacizumab) y anticuerpos contra el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR) (por ejemplo, tal como DC101, producido por el hibridoma DC101 (N.º ATCC FIB-11534)) o moléculas pequeñas (tales como DMXAA (también conocido como Vadimezan o ácido 5,6-dimetil-9-oxo-9/7-xanten-4-il)-acético, disponible en Novartis International AG, Basal, CF4 y Sigma Corp., St. Louis, MO). (Véase también, Albini et al., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 9: 498-509, 2012).

45

50

Anticuerpo: Un polipéptido que se une y reconoce específicamente un analito (antígeno) tal como la proteína TEM8 o un fragmento antigénico de TEM8. El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca diversas estructuras de anticuerpos, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpos, siempre que presenten la actividad de unión a antígeno deseada.

55

Los ejemplos no limitantes de anticuerpos incluyen, por ejemplo, inmunoglobulinas intactas y variantes y fragmentos de las mismas conocidos en la técnica que conservan la afinidad de unión por el antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario (por ejemplo, scFv); y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos de unión a antígeno producidos mediante la modificación de anticuerpos completos o los sintetizados *de novo* usando procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Kontermann y Dubel (Ed), *Antibody Engineering*, Vol. 1-2, 2ª Ed., Springer

60

65

Press, 2010).

Un anticuerpo monocatenario (scFv) es una molécula modificada genéticamente que contiene los dominios V_H y V_L de uno o más anticuerpos unidos por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria genéticamente fusionada (véase, por ejemplo, Bird et al., *Science*, 242: 423-426, 1988; Fluston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85: 5879-5883, 1988; Ahmad et al., *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, doi: 10.1155/2012/980250; Marbry, IDrugs, 13: 543-549, 2010). La orientación intramolecular del dominio V_H y el dominio V_L en un scFv, normalmente no es decisiva para los scFv. Por tanto, pueden usarse scFv con ambas disposiciones posibles (V_H-dominio-enlace dominio-V_L-dominio; V_L-dominio-enlazador dominio-V_H-dominio).

En un dsFv, las cadenas variables de la cadena pesada y ligera se han mutado para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas. También se incluyen diacuerpos, que son anticuerpos bivalentes, biespecíficos, en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero que usan un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de este modo a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 6444-6448, 1993; Poljak et al., *Structure*, 2: 1121-1123, 1994).

Los anticuerpos también incluyen formas modificadas mediante ingeniería genética, tales como anticuerpos quiméricos (tales como anticuerpos murinos humanizados) y anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos). Véase también, *Pierce Catalog and Handbook*, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., *Immunology*, 3ª ed., W.H. Freeman & Co., Nueva York, 1997.

Un "anticuerpo que se une al mismo epítipo" como anticuerpo de referencia se refiere a un anticuerpo que bloquea la unión del anticuerpo de referencia a su antígeno en un ensayo competitivo en un 50 % o más y, por el contrario, el anticuerpo de referencia bloquea la unión del anticuerpo a su antígeno en un ensayo competitivo en un 50 % o más. Se conocen ensayos competitivos de anticuerpos y en el presente documento se proporciona un ensayo competitivo de ejemplo.

Un anticuerpo puede tener uno o más sitios de unión. Si existe más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina de origen natural tiene dos sitios de unión idénticos, un anticuerpo monocatenario o fragmento Fab tiene un sitio de unión, mientras que un anticuerpo biespecífico o bifuncional tiene dos sitios de unión diferentes.

Normalmente, una inmunoglobulina de origen natural tiene cadenas pesadas (H) y ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Los genes de inmunoglobulina incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de dominio variable de inmunoglobulina. Existen dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases (o isotipos) principales de cadena pesada que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE.

Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante (o dominio constante) y una región variable (o dominio variable; véase, por ejemplo, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6.ª edición, W.H. Freeman and Co., página 91 (2007)). En varias realizaciones, las regiones variables de la cadena pesada y ligera se combinan para unirse específicamente al antígeno. En realizaciones adicionales, solo se requiere la región variable de la cadena pesada. Por ejemplo, los anticuerpos de camélidos de origen natural que consisten en una cadena pesada solamente son funcionales y estables en ausencia de cadena ligera (véase, por ejemplo, Hamers-Casterman et al., *Nature*, 363: 446-448, 1993; Sheriff et al., *Nat. Struct. Biol.*, 3: 733-736, 1996). Las referencias a "V_H" o "VH" se refieren a la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo, incluyendo la de un fragmento de unión a antígeno, tal como Fv, scFv, dsFv o Fab. Las referencias a "V_L" o "VL" se refieren al dominio variable de la cadena ligera de un anticuerpo, incluyendo el de un Fv, scFv, dsFv o Fab.

Las regiones variables de la cadena ligera y pesada contienen una región "marco conservada" interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" (véase, por ejemplo, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de los EE.UU., 1991). Las secuencias de las regiones marco conservadas de diferentes cadenas ligeras o pesadas están relativamente conservadas dentro de una especie. La región marco conservada de un anticuerpo, es decir, las regiones marco conservadas combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno. Los límites de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada pueden determinarse fácilmente usando cualquiera de varios esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat et al. ("*Sequences of Proteins of Immunological Interest*", 5ª Ed. Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU., Bethesda, MD, 1991; esquema de numeración "Kabat"), Al-Lazikani et al., (*JMB* 273, 927-948, 1997; esquema de numeración "Chothia") y Lefranc et al. ("*IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*", *Dev. Comp. Immunol.*, 27: 55-77, 2003; esquema de numeración "IMGT"). Las CDR de cada cadena se

denominan normalmente CDR1, CDR2 y CDR3 (desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal) y también se identifican normalmente por la cadena en la que se encuentra la CDR particular. Por tanto, una CDR3 de V_H es la CDR3 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una CDR1 V_L es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra. Las CDR de la cadena ligera en ocasiones se denominan LCDR1, LCDR2 y LCDR3. Las CDR de la cadena pesada en ocasiones se denominan LCDR1, LCDR2 y LCDR3.

Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo producido por un solo clon de linfocitos B o por una célula en la que se ha transfectado el ácido nucleico que codifica las regiones variables ligeras y pesadas del anticuerpo de un solo anticuerpo (o un fragmento de unión a antígeno del mismo), o una progenie de los mismos. Los anticuerpos monoclonales se producen mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, preparando células híbridas formadoras de anticuerpos a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunitarias del bazo. Estas células fusionadas y su progenie se denominan "hibridomas". En algunos ejemplos, los anticuerpos monoclonales se aíslan de un sujeto. Los anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones conservadoras de aminoácidos que no tengan sustancialmente ningún efecto sobre la unión a antígeno u otras funciones de las inmunoglobulinas. (Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (2013)).

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno "humanizado" incluye una región marco conservada humana y una o más CDR de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno no humano (tal como un anticuerpo de ratón, rata o sintético). El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno no humano que proporciona las CDR se denomina "donante", y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humano que proporciona el armazón se denomina "aceptor". En una realización, todas las CDR son de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada. No es necesario que estén presentes las regiones constantes, pero si lo están, pueden ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de inmunoglobulina humana, tal como al menos aproximadamente un 85-90 %, tal como aproximadamente un 95 % o más idénticas. Por tanto, todas las partes de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno humanizado, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de secuencias de anticuerpos humanos naturales.

Un "anticuerpo quimérico" es un anticuerpo que incluye secuencias derivadas de dos anticuerpos diferentes, que normalmente son de especies diferentes. En algunos ejemplos, un anticuerpo quimérico incluye una o más CDR y/o regiones marco conservadas de un anticuerpo humano y CDR y/o regiones marco conservadas de otro anticuerpo humano.

Un "anticuerpo completamente humano" o "anticuerpo humano" es un anticuerpo que incluye, que se basa en secuencias del genoma humano (o derivadas del mismo) y no incluye la secuencia de otra especie. En algunas realizaciones, un anticuerpo humano incluye las CDR, las regiones marco conservadas y (si está presente) una región Fc del genoma humano (o derivada del mismo). Los anticuerpos humanos pueden identificarse y aislarse usando tecnologías para crear anticuerpos basados en secuencias derivadas del genoma humano, por ejemplo, mediante presentación de fagos, o usando animales transgénicos (véase, por ejemplo, Barbas et al. *Phage display: A Laboratory Manual*. 1ª Ed. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004. Print.; Lonberg, *Nat. Biotech.*, 23: 1117-1125, 2005; Lonenberg, *Curr. Opin. Immunol.*, 20: 450-459, 2008)

Afinidad de unión: Afinidad de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo por un antígeno. En una realización, la afinidad se calcula mediante una modificación del procedimiento de Scatchard descrita por Frankel et al., *Mol. Immunol.*, 16: 101-106, 1979. En otra realización, la afinidad de unión se mide mediante una tasa de disociación antígeno/anticuerpo. En otra realización más, una afinidad de unión alta se mide mediante un radioinmunoensayo competitivo. En varios ejemplos, una afinidad de unión alta es de al menos aproximadamente 1×10^{-8} M. En otras realizaciones, una afinidad de unión alta es de al menos aproximadamente $1,0 \times 10^{-9}$, al menos aproximadamente $5,0 \times 10^{-9}$, al menos aproximadamente $1,0 \times 10^{-10}$, al menos aproximadamente $5,0 \times 10^{-10}$ o al menos aproximadamente $1,0 \times 10^{-11}$.

Muestra biológica: Una muestra obtenida de un sujeto. Las muestras biológicas incluyen todas las muestras clínicas útiles para la detección de enfermedades o infecciones (por ejemplo, cáncer o infección antrácica) en sujetos, incluyendo, pero sin limitación, células, tejidos y fluidos corporales, tales como sangre, derivados y fracciones de sangre (tales como suero), líquido cefalorraquídeo; así como tejido biopsiado o extirpado quirúrgicamente, por ejemplo, tejidos no fijados, congelados o fijados en formol o parafina. En un ejemplo particular, se obtiene una muestra biológica de un sujeto que tiene o se sospecha que tiene un tumor; por ejemplo, un sujeto que tiene o se sospecha que tiene cáncer de mama, colorrectal, de pulmón o de piel. En algunos ejemplos, el sujeto tiene o se sospecha que tiene un carcinoma.

Anticuerpo biespecífico: Una molécula recombinante compuesta por dos dominios de unión a antígeno diferentes que, en consecuencia, se unen a dos epítomos antigénicos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos incluyen moléculas unidas química o genéticamente de dos dominios de unión a antígeno. Los dominios de unión a antígeno pueden unirse usando un enlazador. Los dominios de unión a antígeno pueden ser anticuerpos monoclonales, fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, Fab, scFv), eAds, anticuerpos monocatenarios biespecíficos o

combinaciones de los mismos. Un anticuerpo biespecífico puede incluir uno o más dominios constantes, pero no necesariamente incluir un dominio constante. Un ejemplo de un anticuerpo biespecífico es un anticuerpo monocatenario biespecífico que incluye un scFv que se une específicamente a TEM8 unido (a través de un enlazador peptídico) a un scFv que se une específicamente a un antígeno distinto de TEM8. Otro ejemplo es un anticuerpo biespecífico que incluye un Fab que se une específicamente a TEM8 unido a un scFv que se une específicamente a un antígeno distinto de TEM8.

Cáncer de mama: Un tumor neoplásico de tejido mamario que es o tiene potencial para ser maligno. El tipo más común de cáncer de mama es el carcinoma de mama, tal como el carcinoma canalicular. El carcinoma canalicular *in situ* es una afección neoplásica no invasiva de los canalículos. El carcinoma lobular no es una enfermedad invasiva, pero es un indicador de que puede desarrollarse un carcinoma. El carcinoma infiltrante (maligno) de la mama puede dividirse en estadios (I, IIA, IIB, IMA, 11 IB y IV). Véase, por ejemplo, Bonadonna et al., (eds), *Textbook of Breast Cancer: A clinical Guide the Therapy*, 3ª; Londres, Tayloy & Francis, 2006.

Carcinoma: Un tumor maligno que incluye células epiteliales transformadas. Los ejemplos no limitantes de carcinomas incluyen adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma anaplásico y carcinoma de células grandes y pequeñas. En algunos ejemplos, un carcinoma es un carcinoma de mama, carcinoma colorrectal, carcinoma de pulmón o melanoma.

Agente quimioterápico: Cualquier agente químico con utilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por un crecimiento celular anormal. Por ejemplo, los agentes quimioterápicos son útiles para el tratamiento del cáncer, incluyendo el cáncer de mama, colorrectal, de pulmón y de piel. En una realización, un agente quimioterápico es un agente de uso en el tratamiento de un carcinoma. Los ejemplos particulares de agentes terapéuticos adicionales que pueden usarse incluyen agentes de unión a microtúbulos, intercaladores o agentes de entrecruzamiento de ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de la transcripción de ADN y ARN, anticuerpos, enzimas, inhibidores enzimáticos, reguladores génicos e inhibidores de la angiogénesis. En una realización, un agente quimioterápico es un compuesto radioactivo. Otros ejemplos incluyen los fármacos antineoplásicos 5-fluorouracilo (5-FU) e IRT. En ejemplos particulares, dichos agentes quimioterápicos se administran en combinación con un tratamiento que disminuye o reduce la angiogénesis (por ejemplo, antes, durante o después de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más anticuerpos que se unen específicamente a TEM8 o un conjugado de los mismos). Un experto en la materia puede identificar fácilmente un agente quimioterápico de uso (véase, por ejemplo, Slapak y Kufe, *Principles of Cancer Therapy*, Capítulo 86 en *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14ª edición; Perry et al., *Chemotherapy*, Cap. 17 en Abeloff, *Clinical Oncology* 2ª ed., © 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer, L., Berkery, R. (eds): *Oncology Pocket Guide to Chemotherapy*, 2ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer, D.S., Knopf, M.F., Durivage, H.J. (eds): *The Cancer Chemotherapy Handbook*, 4ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993; Chabner y Longo, *Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice* (4ª ed.). Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005; Skeel, *Handbook of Cancer Chemotherapy* (6ª ed.). Lippincott Williams & Wilkins, 2003). La quimioterapia de combinación es la administración de más de un agente para tratar el cáncer.

Anticuerpo quimérico: Un anticuerpo que incluye secuencias derivadas de dos anticuerpos diferentes, tales como de diferentes especies. En algunos ejemplos, un anticuerpo quimérico incluye una o más CDR y/o regiones marco conservadas de un anticuerpo humano y CDR y/o regiones marco conservadas de otro anticuerpo humano.

Receptor de antígeno quimérico (CAR): Un receptor de linfocitos T modificado por ingeniería genética que tiene un dominio de direccionamiento derivado de anticuerpos extracelulares (tal como un scFv) unido a uno o más dominios de señalización intracelular de un receptor de linfocitos T. Un "linfocito T receptor de antígeno quimérico" es un linfocito T que expresa un CAR y tiene especificidad de antígeno determinada por el dominio de direccionamiento derivado de anticuerpo del CAR. Hay disponibles procedimientos de preparación de CAR (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer) (véase, por ejemplo, Park et al., *Trends Biotechnol.*, 29: 550-557, 2011; Grupp et al., *N Engl J Med.*, 368: 1509-1518, 2013; Han et al., *J. Hematol Oncol.*, 6: 47, 2013; Publicaciones PCT WO2012/079000, WO2013/059593; y la Publicación de los EE.UU. 2012/0213783)

Cáncer colorrectal: Un tumor neoplásico de tejido de colon, recto o ano que es o tiene el potencial de ser maligno. Los principales tipos de cáncer colorrectal incluyen carcinomas colorrectales tales como el adenocarcinoma y el carcinoma de células escamosas. El carcinoma infiltrante (maligno) del colon puede dividirse en estadios (I, II, III y IV). Véase, por ejemplo, Blake et al. (eds.), *Gastrointestinal Oncology: A practical Guide*, Berlín: Springer-Verlag, 2011.

Condiciones suficientes para formar un complejo inmunitario: Condiciones que permiten que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se una a su epítipo afín en un grado detectablemente superior a, y/o para la exclusión sustancial de, la unión a sustancialmente todos los otros epítopos. Las condiciones suficientes para formar un complejo inmunitario dependen del formato de la reacción de unión y normalmente son aquellas utilizadas en protocolos de inmunoensayos o aquellas condiciones que se encuentran *in vivo*. Véase Harlow y Lane, citados más adelante, para una descripción de los formatos y condiciones de inmunoensayos. Las condiciones empleadas en los procedimientos son "condiciones fisiológicas" que incluyen referencias a condiciones (por ejemplo, temperatura, osmolaridad, pH) que son típicas dentro de un mamífero vivo o una célula de mamífero. Aunque se

reconoce que algunos órganos están sujetos a condiciones extremas, el entorno intracelular y dentro del organismo normalmente se encuentra a un pH de aproximadamente 7 (por ejemplo, pH de 6,0 a pH 8,0, más normalmente pH de 6,5 a 7,5), contiene agua como disolvente predominante y existe a una temperatura superior a 0 °C e inferior a 50 °C. La osmolaridad está dentro del intervalo que respalda la viabilidad y la proliferación celular.

Conjugado: Un complejo de dos moléculas unidas entre sí, por ejemplo, unidas entre sí mediante un enlace covalente. En una realización, un anticuerpo se une a una molécula efectora; por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a TEM8 unido covalentemente a una molécula efectora. La unión puede ser por medios químicos o recombinantes. En una realización, la unión es química, en donde una reacción entre el resto de anticuerpo y la molécula efectora ha producido un enlace covalente formado entre las dos moléculas para formar una molécula. Puede incluirse opcionalmente un enlazador peptídico (secuencia peptídica corta) entre el anticuerpo y la molécula efectora. Debido a que los conjugados pueden prepararse a partir de dos moléculas con funcionalidades separadas, tales como un anticuerpo y una molécula efectora, en ocasiones también se les conoce como "moléculas quiméricas".

Variante conservadora: Las sustituciones de aminoácidos "conservadoras" son aquellas sustituciones que no disminuyen sustancialmente la afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno (por ejemplo, la afinidad de unión de un anticuerpo por TEM8). Por ejemplo, un anticuerpo humano que se une específicamente a TEM8 puede incluir como máximo aproximadamente 1, como máximo aproximadamente 2, como máximo aproximadamente 5, como máximo aproximadamente 10 o como máximo aproximadamente 15 sustituciones conservadoras y se une específicamente al polipéptido TEM8. La expresión variación conservadora también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido parental sin sustituir, a condición de que el anticuerpo conserve la afinidad de unión por TEM8. Las sustituciones no conservadoras son aquellas que reducen una actividad o unión a TEM8.

Las tablas de sustituciones de aminoácidos conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas por un experto habitual en la materia. Los siguientes seis grupos son ejemplos de aminoácidos que se consideran sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparragina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Puesta en contacto: Colocación en asociación física directa; incluye tanto en forma sólida como líquida, que puede tener lugar *in vivo* o *in vitro*. La puesta en contacto incluye el contacto entre una molécula y otra molécula, por ejemplo, el aminoácido en la superficie de un polipéptido, tal como un antígeno, que entra en contacto con otro polipéptido, tal como un anticuerpo. La puesta en contacto también puede incluir la puesta en contacto con una célula, por ejemplo, colocando un anticuerpo en asociación física directa con una célula.

Control: Un patrón de referencia. En algunas realizaciones, el control es un control negativo, tal como una muestra de tejido obtenida de un paciente que no tiene cáncer o una muestra de tejido de un tejido que no es canceroso. En otras realizaciones, el control es un control positivo, tal como una muestra de tejido obtenida de un paciente diagnosticado con cáncer o una muestra de tejido de un tejido canceroso. En otras realizaciones más, el control es un control histórico o un valor de referencia patrón o un intervalo de valores (tal como una muestra de control sometida a ensayo anteriormente, tal como un grupo de pacientes con cáncer con pronóstico o resultado conocido, o un grupo de muestras que representan valores basales o normales valores).

Una diferencia entre una muestra de ensayo y un control puede ser un aumento o, por el contrario, una disminución. La diferencia puede ser una diferencia cualitativa o una diferencia cuantitativa, por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa. En algunos ejemplos, una diferencia es un aumento o disminución, con respecto a un control, de al menos aproximadamente el 5 %, tal como al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 20 %, al menos aproximadamente el 30 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente el 100 %, al menos aproximadamente el 150 %, al menos aproximadamente el 200 %, al menos aproximadamente el 250 %, al menos aproximadamente el 300 %, al menos aproximadamente el 350 %, al menos aproximadamente el 400 % o al menos aproximadamente el 500 %.

Disminuir o reducir: Reducir la calidad, la cantidad o la intensidad de algo; por ejemplo, una reducción de la carga tumoral. En un ejemplo, una terapia reduce un tumor (tal como el tamaño de un tumor, el número de tumores, la metástasis de un tumor o combinaciones de los mismos) o uno o más síntomas asociados a un tumor (tal como la angiogénesis patológica del tumor o tumores), por ejemplo, en comparación con la respuesta en ausencia de la terapia. En un ejemplo particular, una terapia disminuye el tamaño de un tumor, el número de tumores, la metástasis de un tumor o combinaciones de los mismos, con posterioridad a la terapia, tal como una disminución de al menos el

10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 %. Dichas disminuciones pueden medirse usando los procedimientos que se desvelan en el presente documento.

- 5 **Variante degenerada:** En el contexto de la presente divulgación, una "variante degenerada" se refiere a un polinucleótido que codifica una proteína (por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a TEM8) que incluye una secuencia que es degenerada como resultado del código genético. Existen veinte aminoácidos naturales, la mayor parte de los cuales se especifican mediante más de un codón. Por tanto, se incluyen todas las secuencias de nucleótidos degeneradas siempre que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo que se une a
- 10 TEM8 codificada por la secuencia de nucleótidos no cambie.

Marcador detectable: Una molécula detectable (también conocida como marcador) que se conjuga directa o indirectamente con una segunda molécula, tal como un anticuerpo, para facilitar la detección de la segunda molécula. Por ejemplo, el marcador detectable puede ser susceptible de detección mediante ELISA,

15 espectrofotometría, citometría de flujo, microscopía o técnicas de diagnóstico por imagen (tales como exploraciones por TC, RM, ecografía, examen por fibra óptica y examen laparoscópico). Los ejemplos específicos, no limitantes, de marcadores detectables incluyen fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enlaces enzimáticos, isótopos radiactivos y metales o compuestos pesados (por ejemplo, nanocristales de óxido de hierro súper paramagnéticos para la detección mediante RM). En un ejemplo, un "anticuerpo marcado" se refiere a la incorporación de otra molécula en

20 el anticuerpo. Por ejemplo, el marcador es un marcador detectable, tal como la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de restos biotinilo que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse mediante procedimientos ópticos o colorimétricos). Se conocen en la técnica y pueden usarse diversos procedimientos de marcaje de polipéptidos y glucoproteínas. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos

25 incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (tales como ^{35}S o ^{125}I), marcadores fluorescentes (tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (tales como la peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotinilo, epítomos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (tales como secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos

30 secundarios, dominios de unión a metales, marcadores de epítomo) o agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio. En algunas realizaciones, los marcadores se unen mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico. Se analizan procedimientos para usar marcadores detectables y orientación en la elección de marcadores detectables apropiados para diversos fines, por ejemplo, en Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2012) y Ausubel et al. (*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Nueva York, a través del suplemento 104, 2013).

35

Detección: Identificar la existencia, presencia o hecho de algo. Los expertos en la materia conocen procedimientos generales de detección y pueden complementarse con los protocolos y reactivos que se desvelan en el presente documento. Por ejemplo, en el presente documento se incluyen procedimientos de detección de una célula

40 endotelial que expresa TEM8 en un sujeto. En algunos ejemplos, la detección de una célula endotelial que expresa TEM8 detecta angiogénesis patológica en el sujeto.

Cantidad eficaz: La cantidad de un agente (tal como un anticuerpo específico TEM8 o un conjugado que incluye un anticuerpo específico TEM8) que solo, o junto con uno o más agentes adicionales, induce la respuesta deseada, tal

45 como, por ejemplo, la formación de un complejo inmunitario con TEM8.

Molécula efectora: Una molécula que tiene por objeto a tener o producir un efecto deseado; por ejemplo, un efecto deseado en una célula a la que se dirige la molécula efectora. Las moléculas efectoras incluyen moléculas tales como polipéptidos, radioisótopos y moléculas pequeñas. Los ejemplos no limitantes de moléculas efectoras incluyen

50 toxinas, agentes quimioterápicos y agentes antiangiogénicos. El experto en la materia comprenderá que algunas moléculas efectoras pueden tener o producir más de un efecto deseado. En un ejemplo, una molécula efectora es la porción de una molécula quimérica, por ejemplo, una molécula quimérica que incluye un anticuerpo desvelado o fragmento del mismo, que tiene por objeto a tener un efecto deseado en una célula a la que se dirige la molécula quimérica.

55

Célula endotelial: Una célula del endotelio, que es la capa delgada de células que reviste la superficie interior de los vasos sanguíneos.

Epítomo: Un determinante antigénico. Estos son grupos químicos particulares o secuencias peptídicas en una molécula que son antigénicos, es decir, que desencadenan una respuesta inmunitaria específica. Un anticuerpo se

60 une específicamente a un epítomo antigénico particular en un polipéptido. En algunos ejemplos, un anticuerpo desvelado se une específicamente a un epítomo en TEM8.

Expresado: Traducción de un ácido nucleico en una proteína. Las proteínas pueden expresarse y permanecer intracelulares, convertirse en un componente de la membrana de la superficie celular o secretarse en la matriz o

65 medio extracelular.

Secuencias de control de la expresión: Secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga a la que están unidas operativamente. Las secuencias de control de la expresión están unidas operativamente a una secuencia de ácido nucleico cuando las secuencias de control de la expresión controlan y regulan la transcripción y, según sea apropiado, la traducción de la secuencia de ácido nucleico. Por tanto, las secuencias de control de la expresión pueden incluir promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (es decir, ATG) frente a un gen que codifica proteínas, señal de corte y empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción adecuada de ARNm y codones de parada apropiados. La expresión "secuencias de control" tiene por objeto incluir, como mínimo, componentes cuya presencia pueda influir en la expresión y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias compañeras de fusión. Las secuencias de control de la expresión pueden incluir un promotor.

Un promotor es una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción. También se incluyen aquellos elementos promotores que son suficientes para hacer que la expresión génica dependiente de promotor sea controlable de forma específica de tipo celular, específica de tejido, o inducible por señales o agentes externos; dichos elementos pueden estar ubicados en las regiones 5' o 3' del gen. Se incluyen promotores tanto constitutivos como inducibles (véase, por ejemplo, Bitter et al., *Methods in Enzymology* 153: 516-544, 1987). Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles tales como pL del bacteriófago lambda, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y similares. En una realización, cuando se clona en sistemas de células de mamíferos, pueden usarse promotores derivados del genoma de células de mamíferos (tales como el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (tales como la repetición terminal larga de retrovirus; el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7,5K del virus de la variolovacuna). También pueden usarse promotores producidos mediante técnicas de ADN recombinante o de síntesis para proporcionar la transcripción de las secuencias de ácido nucleico. Puede insertarse un polinucleótido en un vector de expresión que contenga una secuencia promotora que facilite la transcripción eficiente de la secuencia genética insertada del hospedador. El vector de expresión normalmente contiene un origen de replicación, un promotor, así como secuencias de ácido nucleico específicas que permiten la selección fenotípica de las células transformadas.

Vector de expresión: Un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión unidas operativamente a una secuencia de nucleótidos que ha de expresarse. Un vector de expresión comprende suficientes elementos de acción cis para la expresión; la célula hospedadora puede suministrar otros elementos para la expresión o pueden suministrarse en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos aquellos conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, lentivirus, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

Región marco conservada: Secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR en una región variable pesada o ligera de un anticuerpo. Incluye regiones marco conservadas variables ligeras y variables pesadas. Las regiones marco conservadas sirven para mantener las CDR en una orientación apropiada.

IgA: Un polipéptido que pertenece a la clase de anticuerpos que son codificados sustancialmente por un gen alfa de inmunoglobulina reconocido. En seres humanos, esta clase o isotipo incluye IgA₁ y IgA₂. Los anticuerpos IgA pueden existir como monómeros, polímeros (denominados plgA) de forma predominantemente dimérica e IgA secretora. La cadena constante de IgA de tipo silvestre contiene una extensión de 18 aminoácidos en su extremo C-terminal denominada el trozo de la cola (tp). La IgA polimérica es secretada por las células plasmáticas con un péptido de 15 kDa denominado cadena J que une dos monómeros de IgA a través del resto de cisteína conservado en el trozo de la cola.

IgG: Un polipéptido que pertenece a la clase o isotipo de anticuerpos que son codificados sustancialmente por un gen gamma de inmunoglobulina reconocido. En seres humanos, esta clase incluye IgG₁, IgG₂, IgG₃ y IgG₄. En ratones, esta clase incluye IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} y IgG₃.

Complejo inmunitario: La unión de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (tal como un scFv) a un antígeno soluble forma un complejo inmunitario. La formación de un complejo inmunitario puede detectarse a través de procedimientos convencionales conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, inmunohistoquímica, inmunoprecipitación, citometría de flujo, microscopía de inmunofluorescencia, ELISA, inmunotransferencia (por ejemplo, transferencia Western), resonancia magnética, exploraciones por TC, rayos X y cromatografía de afinidad. Las propiedades de unión inmunitaria de los anticuerpos seleccionados pueden cuantificarse usando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Inhibición o tratamiento de una enfermedad: Una intervención terapéutica (por ejemplo, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a TEM8 o un conjugado del mismo) que reduce un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica relacionada con una enfermedad (tal como un tumor o una infección antrácica). El tratamiento también puede inducir la remisión o cura de una afección, tal como un tumor o una infección antrácica. En ejemplos particulares, el tratamiento incluye la prevención de un tumor,

por ejemplo, inhibiendo el desarrollo completo de un tumor, tal como prevenir el desarrollo de una metástasis o el desarrollo de un tumor primario. La prevención no requiere una ausencia total de un tumor.

La reducción de un signo o síntoma de una enfermedad o afección patológica relacionada con una enfermedad, se refiere a cualquier efecto beneficioso observable del tratamiento. La reducción de un signo o síntoma asociado a un tumor (tal como la angiogénesis patológica) puede evidenciarse, por ejemplo, por un inicio retardado de los síntomas clínicos de la enfermedad en un sujeto susceptible (tal como un sujeto que tiene un tumor que aún no ha metastatizado), una reducción en la gravedad de algunos o todos los síntomas clínicos de la enfermedad, una progresión más lenta de la enfermedad (por ejemplo, mediante la prolongación de la vida de un sujeto que tiene un tumor), una reducción en el número de recaídas de la enfermedad, una mejora en la salud general o el bienestar del sujeto, o por otros parámetros bien conocidos en la técnica que son específicos del tumor particular. Un tratamiento "profiláctico" es un tratamiento administrado a un sujeto que no presenta signos de una enfermedad o presenta solo signos precoces con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología.

Aislado: Un componente biológico (tal como un ácido nucleico, un péptido, una proteína o un complejo de proteínas, por ejemplo, un anticuerpo) que se ha separado sustancialmente, se ha producido apartado o se ha purificado de entre otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que el componente aparece de forma natural, es decir, otros ADN y ARN cromosómicos y extracromosómicos y proteínas. Por tanto, los ácidos nucleicos aislados, los péptidos y las proteínas incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados mediante procedimientos de purificación convencionales. El término también abarca ácidos nucleicos, péptidos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula hospedadora, así como, ácidos nucleicos sintetizados químicamente. Un ácido nucleico, péptido o proteína aislados, por ejemplo, un anticuerpo, puede tener una pureza de al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %.

K_d: La constante de disociación para una interacción dada, tal como una interacción polipéptido-ligando o una interacción anticuerpo-antígeno. Por ejemplo, para la interacción bimolecular de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (tal como 35022 o un fragmento de unión a antígeno del mismo) y un antígeno (tal como proteína TWM8) es la concentración de los componentes individuales de la interacción bimolecular dividida por la concentración del complejo.

Enlazador: Una molécula bifuncional que puede usarse para unir dos moléculas en una molécula contigua, por ejemplo, para unir una molécula efectora a un anticuerpo. En algunas realizaciones, los conjugados proporcionados incluyen un enlazador entre la molécula efectora o marcador detectable y un anticuerpo. En algunas realizaciones, el enlazador es escindible selectivamente, por ejemplo, escindible en condiciones intracelulares, de manera que la escisión del enlazador libera la molécula efectora o marcador detectable del anticuerpo en el entorno intracelular. La escisión selectiva se refiere a la escisión en respuesta a una condición o un estímulo preseleccionados. En otras realizaciones más, el enlazador no es escindible y la molécula efectora o el marcador detectable pueden liberarse, por ejemplo, mediante degradación de anticuerpos. En algunos casos, un enlazador es un péptido dentro de un fragmento de unión a antígeno (tal como un fragmento Fv) que sirve para unir indirectamente la cadena pesada variable a la cadena ligera variable.

Los términos "conjugación", "conexión", "unión" o "enlace" pueden referirse a convertir dos moléculas en una molécula contigua; por ejemplo, unir dos polipéptidos en un polipéptido contiguo o unir covalentemente una molécula efectora o un radionúclido marcador detectable u otra molécula a un polipéptido, tal como un scFv. En el contexto específico, los términos incluyen referencia a unir un ligando, tal como un resto de anticuerpo, a una molécula efectora. El enlace puede ser por medios químicos o recombinantes. "Medios químicos" se refiere a una reacción entre el resto de anticuerpo y la molécula efectora de manera que se forme un enlace covalente entre las dos moléculas para formar una molécula.

Cáncer de pulmón: Un tumor neoplásico de tejido pulmonar que es o tiene el potencial de ser maligno. Los principales tipos de cáncer de pulmón son los carcinomas de pulmón: adenocarcinoma, carcinoma microcítico, carcinoma de células escamosas o carcinoma no microcítico. El cáncer de pulmón normalmente se estadifica de I a IV; también se usan otras clasificaciones, por ejemplo, el carcinoma de pulmón microcítico puede clasificarse como *estadio limitado* si está confinado a la mitad del tórax y dentro del alcance de un solo campo de radioterapia; de lo contrario, es de *estadio extenso*. Véase, por ejemplo, Hansen (ed.), *Textbook of Lung Cancer*, 2ª, Londres: Informa Healthcare, 2008.

Anticuerpo neutralizante: Un anticuerpo que puede unirse específicamente a una proteína diana de manera que inhiba una función biológica asociada a esa proteína diana. En general, cualquier proteína que pueda realizar este tipo de actividad de bloqueo específica se considera una proteína neutralizante; por tanto, los anticuerpos neutralizantes son una clase específica de proteína neutralizante.

Neoplasia, cáncer o tumor: Una neoplasia es un crecimiento anormal de tejido o células que es resultado de una división celular excesiva. El crecimiento neoplásico puede producir un tumor. La cantidad de un tumor en un individuo es la "carga tumoral" que puede medirse como el número, el volumen o el peso del tumor. Un tumor que no

metastatiza se denomina "benigno". Un tumor que invade el tejido circundante o puede metastatizar (o ambos) se denomina "maligno".

Los tumores del mismo tipo de tejido son tumores primarios que se originan en un órgano particular (tal como colon, piel, mama, próstata, vejiga o pulmón). Los tumores del mismo tipo de tejido pueden dividirse en tumores de diferentes subtipos. Por ejemplo, los carcinomas de pulmón pueden dividirse en un adenocarcinoma, tumores microcíticos, de células escamosas o no microcíticos.

Los ejemplos de tumores sólidos, tales como los sarcomas (cáncer de tejido conectivo) y los carcinomas (cáncer de células epiteliales), incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma colorrectal, neoplasia maligna linfóide, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cánceres de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitomas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga y tumores del SNC (tales como un glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

Ácido nucleico: Un polímero compuesto por unidades de nucleótidos (ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, variantes estructurales relacionadas de origen natural y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos) unidos a través de enlaces fosfodiéster, variantes estructurales relacionadas de origen natural y análogos sintéticos de origen no natural de los mismos. Por tanto, la expresión incluye polímeros de nucleótidos en los que los nucleótidos y las uniones entre ellos incluyen análogos sintéticos de origen no natural, tales como, por ejemplo, y sin limitación, fosforotioatos, fosforoamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2-O-ribonucleótidos de metilo, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y similares. Dichos polinucleótidos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN automatizado. El término "oligonucleótido" se refiere normalmente a polinucleótidos cortos, generalmente no superiores a aproximadamente 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos está representada por una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), esto también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la que "U" reemplaza "T".

En el presente documento se usa la notación convencional para describir secuencias de nucleótidos: el extremo izquierdo de una secuencia de nucleótidos monocatenaria es el extremo 5'; la dirección izquierda de una secuencia de nucleótidos bicatenaria se denomina dirección 5'. La dirección de la adición de 5' a 3' de nucleótidos a transcritos de ARN nacientes se denomina dirección de transcripción. La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se denomina "cadena codificante"; las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que un ARNm transcrito a partir de ese ADN y que se encuentran en 5' con respecto al extremo 5' del transcrito de ARN se denominan "secuencias corriente arriba"; Las secuencias en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en 3' con respecto al extremo 3' del transcrito de ARN codificante se denominan "secuencias corriente abajo".

"ADNc" se refiere a un ADN que es complementario o idéntico a un ARNm, en forma monocatenaria o bicatenaria.

"Codificación" se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia definida de nucleótidos (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de los mismos. Por tanto, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm producido por ese gen producen la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la cadena codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y por lo general se proporciona en listados de secuencias, como la cadena no codificante, utilizada como molde para la transcripción, de un gen o ADNc pueden denominarse codificantes de la proteína u otro producto de ese gen o ADNc. A menos que se especifique lo contrario, una "secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos" incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

Un polinucleótido o secuencia de ácido nucleico se refiere a una forma polimérica de nucleótido de al menos 10 bases de longitud. Un polinucleótido recombinante incluye un polinucleótido que no está inmediatamente contiguo a las dos secuencias codificantes a las que está inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo del que deriva. Por tanto, la expresión incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector; en un plásmido o virus que se replica de forma autónoma; o en el ADN genómico de un procarionte o eucarionte, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc) independiente de otras secuencias. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o formas modificadas de cualquiera de los nucleótidos. La expresión incluye formas monocatenarias y bicatenarias de ADN.

Unido operativamente: Una primera secuencia de un ácido nucleico está unida operativamente con una segunda secuencia de un ácido nucleico cuando la primera secuencia de un ácido nucleico se coloca en una relación funcional con la segunda secuencia de un ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor, tal como el promotor CMV, está unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor afecta a la transcripción o la expresión de la secuencia codificante. En general, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, están en el mismo marco de lectura.

Angiogénesis patológica: Angiogénesis que no es médicamente deseable o es dañina para un sujeto, tal como la angiogénesis asociada a un tumor o la generación de vasos sanguíneos dentro o alrededor de un tumor. La vasculatura tumoral puede ser distinta de la vasculatura normal en que pueden expresarse varios genes diferencialmente en vasos sanguíneos asociados a tumores (St. Croix et al., *Science*, 289, 1197-1202, 2000). Uno de estos genes, el marcador endotelial tumoral 8 (TEM 8), está regulado positivamente en la vasculatura de tumores sólidos malignos, con expresión limitada en tejidos sanos. Otros ejemplos de angiogénesis patológica incluyen la angiogénesis corneal o retiniana (tal como en un trasplante corneal o en la retina de un sujeto con degeneración macular o diabetes).

Vehículos farmacéuticamente aceptables: Los vehículos farmacéuticamente aceptables de uso son convencionales. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 19ª edición, 1995, describe composiciones y formulaciones adecuadas para la entrega farmacéutica de los anticuerpos desvelados.

En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo particular de administración que se emplee. Por ejemplo, las formulaciones parenterales por lo general comprenden líquidos inyectables que incluyen líquidos farmacéuticamente y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, píldora, comprimido o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón y estearato de magnesio. Además de vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que han de administrarse pueden contener cantidades menores de sustancias adyuvantes no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes tamponadores del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaurato de sorbitano. En realizaciones particulares, adecuadas para la administración a un sujeto, el vehículo puede ser estéril y/o estar suspendido en una forma de dosificación unitaria que contenga una o más dosis medidas de la composición adecuada para inducir la respuesta deseada. También puede ir acompañado de medicamentos para su uso con fines de tratamiento. La forma de dosificación unitaria puede estar, por ejemplo, en un vial sellado que contenga contenido estéril o una jeringuilla para inyección en un sujeto.

Polipéptido: Un polímero en el que los monómeros son restos de aminoácidos que se unen a través de enlaces amida. Cuando los aminoácidos son aminoácidos alfa, puede usarse o bien el isómero óptico L o bien el isómero óptico D, prefiriéndose los isómeros L. Los términos "polipéptido" o "proteína" como se usan en el presente documento tienen por objeto abarcar cualquier secuencia de aminoácidos e incluyen secuencias modificadas tales como glucoproteínas. Un polipéptido incluye proteínas de origen natural, así como aquellas que se producen de forma recombinante o sintética. Un polipéptido tiene un extremo amino terminal (N-terminal) y un extremo carboxi-terminal. En algunas realizaciones, el polipéptido es un anticuerpo desvelado o un fragmento del mismo.

Modificaciones de polipéptidos: Los polipéptidos pueden modificarse mediante una diversidad de técnicas químicas para producir derivados que tengan esencialmente la misma actividad y conformación que los péptidos sin modificar y opcionalmente tengan otras propiedades deseables. Por ejemplo, pueden proporcionarse grupos ácido carboxílico de la proteína, ya sea de carboxilo terminal o de cadena lateral, en forma de una sal de un catión farmacéuticamente aceptable o pueden esterificarse para formar un éster C₁-C₁₆ o pueden convertirse en una amida de fórmula NR₁R₂ en donde R₁ y R₂ son cada uno independientemente H o alquilo C₁-C₁₆, o pueden combinarse para formar un anillo heterocíclico, tal como un anillo de 5 o 6 miembros. Los grupos amino del péptido, ya sea de amino terminal o de cadena lateral, pueden estar en forma de una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable, tal como el HCl, HBr, acético, benzoico, toluenosulfónico, maleico, tartárico y otras sales orgánicas, o pueden modificarse a alquil C₁-C₁₆ o dialquil amino o convertirse adicionalmente en una amida.

Los grupos hidroxilo de las cadenas laterales del péptido pueden convertirse en alcoxi C₁-C₁₆ o en un éster C₁-C₁₆ usando técnicas bien reconocidas. Los anillos de fenilo y fenólicos de las cadenas laterales del péptido pueden estar sustituidos con uno o más átomos de halógeno, tales como F, Cl, Br o I, o con alquilo C₁-C₁₆, alcoxi C₁-C₁₆, ácidos carboxílicos y ésteres de los mismos, o amidas de dichos ácidos carboxílicos. Los grupos metileno de las cadenas laterales del péptido pueden prolongarse a alquilenos C₂-C₄ homólogos. Los tioles pueden protegerse con uno cualquiera de varios grupos protectores bien reconocidos, tales como los grupos acetamida.

Purificado: El término purificado no requiere pureza absoluta; si no que, se concibe como un término relativo. Por tanto, por ejemplo, una preparación de péptido purificada es una en la que el péptido o la proteína (tal como un anticuerpo) está más enriquecido que el péptido o la proteína en su entorno natural dentro de una célula. En una

realización, una preparación se purifica de manera que la proteína o péptido represente al menos el 50 % del contenido total de péptido o proteína de la preparación, tal como al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o más del contenido total de péptido o proteína.

5 Identidad de secuencia: La similitud entre secuencias de aminoácidos se expresa en términos de la similitud entre las secuencias, también denominada identidad de secuencia. La identidad de secuencia se mide con frecuencia en términos de porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor sea el porcentaje, más similares son las dos secuencias. Los homólogos o variantes de un polipéptido poseerán un grado relativamente alto de identidad de secuencia cuando se alineen usando procedimientos convencionales.

Se conocen bien en la técnica procedimientos de alineación de secuencias para la comparación. Se describen diversos programas y algoritmos de alineación en: Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981; Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970; Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444, 1988; Higgins y Sharp, *Gene* 73: 237, 1988; Higgins y Sharp, *CABIOS* 5: 151, 1989; Corpet et al., *Nucleic Acids Research* 16: 10881, 1988; y Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444, 1988. Altschul et al., *Nature Genet.* 6: 119, 1994, presenta una consideración detallada de procedimientos de alineación de secuencias y cálculos de homología.

La herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del NCBI (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403, 1990) está disponible en varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD) y en Internet, para su uso junto con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, blastn y tblastx. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia usando este programa está disponible en el sitio web del NCBI en Internet.

Los homólogos y variantes de un V_L o un V_H de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido se caracterizan normalmente por la posesión de una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 75 %, por ejemplo, al menos aproximadamente el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 91 %, el 92 %, el 93 %, el 94 %, el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 %, contada sobre la alineación de longitud completa con la secuencia de aminoácidos de interés. Las proteínas con una similitud aún mayor con las secuencias de referencia mostrarán identidades crecientes en porcentaje cuando se evalúen mediante este procedimiento, tal como una identidad de secuencia de al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %. Cuando se compara menos de la secuencia completa para determinar la identidad de secuencia, los homólogos y variantes normalmente poseerán una identidad de secuencia de al menos el 80 % sobre ventanas cortas de 10-20 aminoácidos y pueden poseer identidades de secuencia de al menos el 85 % o al menos el 90 % o el 95 % dependiendo de su similitud con la secuencia de referencia. Hay disponibles procedimientos para determinar la identidad de secuencia en ventanas cortas de este tipo en el sitio web del NCBI en Internet. Un experto en la materia apreciará que estos intervalos de identidad de secuencia se proporcionan solo como guía; es muy posible que puedan obtenerse homólogos muy significativos que se encuentren fuera de los intervalos proporcionados.

Las expresiones utilizadas para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos incluyen "secuencia de referencia", "seleccionado entre", "ventana de comparación", "idéntico", "porcentaje de identidad de secuencia", "sustancialmente idéntico", "complementario", y "sustancialmente complementario".

Para la comparación de secuencias de secuencias de ácido nucleico, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se usan los parámetros del programa predeterminados. Se conocen bien en la técnica procedimientos de alineación de secuencias para la comparación. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482, 1981, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443, 1970, mediante el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85: 2444, 1988, mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4ª Ed, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2012) y Ausubel et al. (En *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Nueva York, a través del suplemento 104, 2013). Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP usa una simplificación del procedimiento de alineación progresiva de Feng y Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35: 351-360, 1987. El procedimiento utilizado es similar al procedimiento descrito por Higgins y Sharp, *CABIOS* 5: 151-153, 1989. Usando PILEUP, se compara una secuencia de referencia con otras secuencias de ensayo para determinar la relación de porcentaje de identidad de secuencia usando los siguientes parámetros: peso de hueco predeterminado (3,00), peso y longitud de hueco predeterminados (0,10) y huecos finales ponderados. PILEUP puede obtenerse del paquete de software de análisis de secuencia GCG, por ejemplo, versión 7.0 (Devereaux et al., *Nuc. Acids Res.* 12: 387-395, 1984).

Otro ejemplo de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud

de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990 y Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1977. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (ncbi.nlm.nih.gov). El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas cadenas. El programa BLASTP (para secuencias de aminoácidos) usa como valores predeterminados una longitud de palabra (W) de 3 y una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915, 1989). Un oligonucleótido es una secuencia polinucleotídica lineal de una longitud de hasta aproximadamente 100 bases nucleotídicas.

Cáncer de piel: Un tumor neoplásico de tejido cutáneo que es o tiene el potencial de ser maligno. El melanoma es un cáncer de piel de melanocitos transformados (células que producen el pigmento melanina). Los melanocitos se encuentran principalmente en la piel, pero también están presentes en el intestino y los ojos. El melanoma en la piel incluye melanoma de propagación superficial, melanoma nodular, melanoma lentiginoso acral y lentigo maligno (melanoma). Cualquiera de los tipos anteriores puede producir melanina o puede ser amelanótico. Análogamente, cualquier subtipo puede mostrar desmoplasia (reacción fibrosa densa con neurotropismo), que es un marcador de comportamiento agresivo y una tendencia a la recurrencia local. Otros melanomas incluyen el sarcoma de células claras, el melanoma de la mucosa y el melanoma uveal. El melanoma se estadifica de I a IV. Véase, por ejemplo, Thompson et al. (eds), *Textbook of Melanoma: Pathology, Diagnosis and Management*, Londres: Taylor & Francis, 2004.

Unión específica: Cuando se refiere a un anticuerpo, se refiere a una reacción de unión que determina la presencia de una proteína, péptido o polisacárido diana en presencia de una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por tanto, en condiciones designadas, un anticuerpo se une preferentemente a una proteína, péptido o polisacárido diana particular (tal como un epítipo de TEM8) y no se une en una cantidad significativa a otras proteínas o polisacáridos presentes en la muestra o el sujeto. La unión específica puede determinarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Con referencia a un complejo anticuerpo-antígeno, la unión específica del antígeno y el anticuerpo tiene una K_d de menos de aproximadamente 10^{-7} Molar (M), tal como menos de aproximadamente 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M o incluso menos de aproximadamente 10^{-11} M.

Los anticuerpos que se desvelan en el presente documento se unen específicamente a una diana definida (o múltiples dianas, en el caso de un anticuerpo biespecífico). Por tanto, un anticuerpo que se une específicamente a TEM8 es un anticuerpo que se une sustancialmente a TEM8, incluyendo células o tejidos que expresan TEM8, sustrato al que se une TEM8 o TEM8 en una muestra de ensayo biológica. Se reconoce, por supuesto, que puede producirse un determinado grado de interacción no específica entre un anticuerpo o conjugado que incluye un anticuerpo (tal como un anticuerpo que se une específicamente a TEM8 o un conjugado que incluye dicho anticuerpo) y una no diana (tal como una célula que no expresa TEM8). Normalmente, la unión específica da como resultado una asociación mucho más fuerte entre el anticuerpo y la proteína o las células que llevan el antígeno que entre el anticuerpo y la proteína o las células que carecen del antígeno. La unión específica normalmente da como resultado un aumento de más de 2 veces, tal como un aumento de más de 5 veces, de más de 10 veces o de más de 100 veces en la cantidad de anticuerpo unido (por unidad de tiempo) a una proteína que incluye el epítipo o la célula o tejido que expresa el epítipo diana en comparación con una proteína o célula o tejido que carece de este epítipo. La unión específica a una proteína en dichas condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para una proteína particular. Una diversidad de formatos de inmunoensayo es apropiada para seleccionar anticuerpos u otros ligandos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan rutinariamente inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (2013), para obtener una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que pueden usarse para determinar la inmunorreactividad específica.

Sujeto: Cualquier mamífero, tal como seres humanos, primates no humanos, cerdos, ovejas, vacas, roedores y similares. En dos ejemplos no limitantes, un sujeto es un sujeto humano o un sujeto murino. Por tanto, el término "sujeto" incluye sujetos tanto humanos como veterinarios.

Linfocito T: Un glóbulo blanco crítico para la respuesta inmunitaria. Los linfocitos T incluyen, pero sin limitación, linfocitos T $CD4^+$ y linfocitos T $CD8^+$. Un linfocito T $CD4^+$ es una célula inmunitaria que expresa CD4 en su superficie. Estas células, también conocidas como linfocitos T auxiliares, ayudan a orquestar la respuesta inmunitaria, incluyendo las respuestas de anticuerpos, así como las respuestas de linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos Th1 y Th2 son subconjuntos funcionales de linfocitos T auxiliares. Los linfocitos Th1 secretan un conjunto de citocinas, incluyendo el interferón gamma, cuya función principal es estimular la defensa mediada por fagocitos contra infecciones, especialmente relacionadas con microbios intracelulares. Los linfocitos Th2 secretan un conjunto de citocinas, incluyendo la interleucina (IL)-4 y la IL-5, cuyas funciones principales son estimular IgE y las reacciones inmunitarias mediadas por eosinófilos/mastocitos y regular negativamente las respuestas de Th1.

Agente terapéutico: Utilizado en un sentido genérico, incluye agentes de tratamiento, agentes profilácticos y agentes de reemplazo. Se usa un agente terapéutico para mejorar un conjunto específico de afecciones en un sujeto

con una enfermedad o un trastorno.

Cantidad terapéuticamente eficaz: La cantidad de un agente (tal como un anticuerpo específico TEM8 o un conjugado que incluye un anticuerpo específico TEM8) que solo, o junto con uno o más agentes adicionales, induce la respuesta deseada, tales como, por ejemplo, el tratamiento de un tumor o el tratamiento del ántrax, en un sujeto. Cuando se administre a un sujeto, generalmente se usará una dosis que consiga las concentraciones tisulares objetivo que se ha demostrado que consiguen un efecto *in vitro* deseado. Idealmente, una cantidad terapéuticamente eficaz proporciona un efecto terapéutico sin provocar un efecto citotóxico sustancial en el sujeto.

En un ejemplo, una respuesta deseada es disminuir el tamaño, el volumen o el número (tal como las metástasis) de un tumor en un sujeto. Por ejemplo, el agente o agentes pueden disminuir el tamaño, el volumen o el número de tumores en una cantidad deseada, por ejemplo, en al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 15 %, al menos el 20 %, al menos el 25 %, al menos el 30 %, al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % en comparación con una respuesta en ausencia del agente.

Varias preparaciones que se desvelan en el presente documento se administran en cantidades terapéuticamente eficaces. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a TEM8 o fragmento de unión a antígeno del mismo, o conjugado del mismo (o una composición que incluye una o más de estas moléculas) que se administra a un sujeto humano o veterinario variará dependiendo de una serie de factores asociados a ese sujeto, por ejemplo, la salud global del sujeto. Puede determinarse una cantidad terapéuticamente eficaz variando la dosis y midiendo la respuesta terapéutica resultante, tal como la regresión de un tumor. También pueden determinarse cantidades terapéuticamente eficaces mediante diversos inmunoensayos *in vitro*, *in vivo* o *in situ*. Los agentes desvelados pueden administrarse en una dosis única o en varias dosis, según sea necesario para obtener la respuesta deseada. Sin embargo, la cantidad terapéuticamente eficaz puede depender de la fuente aplicada, del sujeto que se está tratando, de la gravedad y del tipo de la afección que ha de tratarse, y de la forma de administración.

Toxina: Una molécula efectora que induce citotoxicidad cuando entra en contacto con una célula. Los ejemplos específicos, no limitantes de toxinas incluyen, pero sin limitación, abrina, ricina, auristatinas (tales como la monometil auristatina E (MMAE; véase por ejemplo, Francisco et al., *Blood*, 102: 1458-1465, 2003)) y monometil auristatina F (MMAF; véase, por ejemplo, Doronina et al., *BioConjugate Chem.*, 17: 114-124, 2006), maitansinoides (tales como DM1; véase, por ejemplo, Phillips et al., *Cancer Res.*, 68: 9280-9290, 2008), exotoxina de *Pseudomonas* (PE, tal como PE35, PE37, PE38 y PE40), toxina diftérica (DT), toxina botulínica, saporina, restrictocina o gelonina, o toxinas modificadas de las mismas, u otros agentes tóxicos que inhiben directa o indirectamente el crecimiento celular o destruyen células. Por ejemplo, PE y DT son compuestos altamente tóxicos que normalmente provocan la muerte por toxicidad hepática. PE y DT, sin embargo, pueden modificarse en una forma para su uso como inmunotoxina retirando el componente de direccionamiento nativo de la toxina (tal como el dominio la de PE y la cadena B de DT) y reemplazándolo con un resto de direccionamiento diferente, tal como un anticuerpo.

Transformada: Una célula transformada es una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico mediante técnicas de biología molecular. Como se usa en el presente documento, el término transformación abarca todas las técnicas mediante las cuales podría introducirse una molécula de ácido nucleico en una célula de este tipo, incluyendo la transfección con vectores víricos, la transformación con vectores plasmídicos y la introducción de ADN mediante electroporación, lipofección y aceleración con cañón de partículas.

Carga tumoral: El volumen, número, metástasis totales, o combinaciones de los mismos, de un tumor o tumores en un sujeto.

Marcador endotelial tumoral 8 (TEM8): Una proteína también conocida como Receptor 1 de Toxina Antrácica (ANTXR1). TEM8 es una glucoproteína de la superficie celular identificada originariamente basándose en su sobreexpresión en las células endoteliales que revisten la vasculatura tumoral del cáncer colorrectal humano (St Croix et al., *Science*, 289 (5482): 1197-1202, 2000). A diferencia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el receptor de VEGF (VEGFR) y muchos otros reguladores clave de la angiogénesis, TEM8 no es necesario para la angiogénesis del desarrollo, la cicatrización de heridas o la angiogénesis fisiológica normal del cuerpo lúteo (St Croix et al., *Science*, 289 (5482): 1197-1202, 2000; Nanda et al., *Cancer Res.*, 64 (3): 817-820, 2004). TEM8 se regula positivamente en los vasos tumorales de diversos tipos de tumores tanto en ratones como en seres humanos (Nanda et al., *Cancer Res.*, 64 (3): 817-820, 2004; Carson-Walter et al., *Cancer Res.*, 61 (18): 6649-6655, 2001) y en algunos tumores también es expresada por las propias células tumorales (Carson-Walter et al. *Cancer Res.*, 61 (18): 6649-6655, 2001; Yang et al., *Biochim Biophys Acta*, 1813 (1): 39-49, 2011). TEM8 también actúa como un receptor de la superficie celular para la toxina antrácica y comparte una identidad de aminoácidos del 58 % con CMG2 (también conocido como ANTXR2), que es un segundo receptor para la proteína toxina antrácica (Scobie et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (9): 5170-5174, 2003).

La secuencia proteínica de TEM8 se conoce (véase, por ejemplo, N.º de acceso de GENBANK® NP_115584.1, como está presente en la base de datos el 10 de septiembre de 2013). Adicionalmente, se conocen secuencias de ácido nucleico presente de ejemplo que codifican la proteína TEM8 (véase, por ejemplo, N.º de acceso de GENBANK®

NM_032208.2 como está presente en la base de datos el 10 de septiembre de 2013). En un ejemplo, TEM8 es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 10.

Microentorno tumoral: El entorno celular en el que existe un tumor, incluyendo vasos sanguíneos circundantes, células inmunitarias, fibroblastos, moléculas de señalización y la matriz extracelular (ECM), incluyendo las células del estroma. Los tumores pueden influir en el microentorno liberando señales extracelulares, promoviendo la angiogénesis patológica e induciendo tolerancia inmunitaria periférica, mientras que las células inmunitarias en el microentorno pueden afectar al crecimiento y a la evolución de las células cancerosas, tal como en la inmunomodulación.

En condiciones suficientes para: Una frase que se usa para describir cualquier entorno que permita una actividad deseada. En un ejemplo, la actividad deseada es la formación de un complejo inmunitario. En ejemplos particulares, la actividad deseada es el tratamiento de un tumor.

Vector: Una molécula de ácido nucleico como se introduce en una célula hospedadora, produciendo de este modo una célula hospedadora transformada. Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permitan replicarse en una célula hospedadora, tal como un origen de replicación. Un vector también puede incluir uno o más genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica.

II. Descripción de varias realizaciones

Se proporcionan anticuerpos monoclonales aislados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a un epítipo en la proteína TEM8. Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno pueden ser completamente humanos. En varias realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno pueden usarse para neutralizar la infección por VIH-1. En el presente documento también se desvelan composiciones que incluyen los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, vectores de expresión que incluyen estos ácidos nucleicos y células hospedadoras aisladas que expresan los ácidos nucleicos.

Pueden usarse composiciones que comprenden los anticuerpos monoclonales específicos para TEM8 con fines de investigación, de diagnóstico y terapéuticos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden usarse para diagnosticar o tratar a un sujeto que tiene angiogénesis patológica.

A. Anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno

Se proporcionan anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno aislados que se unen específicamente a un epítipo en la proteína TEM8 y se neutralizan. En varias realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno pueden neutralizar una función o propiedad biológica de la proteína TEM8 *in vivo*, incluyendo, pero sin limitación, una reducción y/o inhibición de la angiogénesis patológica, una reducción y/o inhibición del crecimiento tumoral o una reducción y/o inhibición de la metástasis tumoral.

Los anticuerpos monoclonales incluyen una cadena pesada que comprende una región determinante de complementariedad de la cadena pesada (HCDR) 1, una HCDR2 y una HCDR3, y una cadena ligera que comprende una región determinante de complementariedad de la cadena ligera (LCDR) 1, LCDR2 y LCDR3. Los anticuerpos desvelados se unen específicamente a un epítipo de TEM8 y son neutralizantes. Los anticuerpos específicos de TEM8 incluyen una cadena pesada variable (V_H) y una cadena ligera variable (V_L) y se unen específicamente a TEM8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo incluye regiones variables de la cadena pesada y ligera que incluyen HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y LCDR1, LCDR2 y LCDR3, respectivamente, del anticuerpo m825.

El análisis de los anticuerpos monoclonales a continuación se refiere a anticuerpos monoclonales aislados que incluyen dominios variables de la cadena pesada y ligera que incluyen al menos una región determinante de complementariedad (CDR), tal como una CDR1, CDR2 y CDR3. El experto habitual en la materia comprenderá que pueden usarse diversos esquemas de numeración de CDR (tales como los esquemas de numeración de Kabat, Chothia o IMGT) para determinar las posiciones de las CDR. La secuencia de aminoácidos y las posiciones de CDR de la cadena pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales m825, m822, m830 y m863 de acuerdo con los esquemas de numeración IMGT y Kabat se muestran en la Tabla 1 (IMGT) y la Tabla 2 (Kabat). El experto en la materia comprenderá fácilmente el uso de diversos esquemas de numeración de CDR cuando haga referencia a aminoácidos particulares de los anticuerpos que se desvelan en el presente documento.

Tabla 1. Secuencias de CDR de IMGT de anticuerpos específicos contra TEM8

m825					
	SEQ ID NO: 1	Secuencia de A.A.		SEQ ID NO: 2	Secuencia de A.A.
HCDR1	26-33	GYTFSSY A	LCDR1	26-31	NLRDFY
HCDR2	51-58	IIPFGTT	LCDR2	49-51	GKN
HCDR3	97-106	ARDDYMFY	LCDR3	88-97	SSRDNSKHVV

(continuación)

m822					
	SEQ ID NO: 3	Secuencia de A.A.		SEQ ID NO: 4	Secuencia de A.A.
HCDR1	26-33	GYTFSSY A	LCDR1	26-31	NLRDFY
HCDR2	51-58	IPIFGTA	LCDR2	49-51	GKN
HCDR3	97-106	ARDTDYMFY	LCDR3	88-97	SSRDNSKHVV
m830					
	SEQ ID NO: 5	Secuencia de A.A.		SEQ ID NO: 6	Secuencia de A.A.
HCDR1	26-33	GFTFSTYT	LCDR1	27-32	QTISRY
HCDR2	51-58	ISNDGSNK	LCDR2	50-52	AAS
HCDR3	97-110	VRGSSWYRGNWFDP	LCDR3	89-97	QQTYSPPIT
m863					
	SEQ ID NO: 7	Secuencia de A.A.		SEQ ID NO: 8	Secuencia de A.A.
HCDR1	26-33	GYFTGY	LCDR1	27-32	RAISRY
HCDR2	51-58	INPTSGST	LCDR2	50-52	AAS
HCDR3	97-110	VRDPGSPKWLA FDP	LCDR3	89-97	QQTYSPPIT

El anticuerpo incluye CDR de IMGT, tales como las enumeradas en la Tabla 1. El anticuerpo reivindicado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-33, 51-58 y 97-106 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-33, 51-58 y 97-106 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-33, 51-58 y 97-110 de la SEQ ID NO: 5, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-33, 51-58 y 97-110 de la SEQ ID NO: 7, respectivamente.

El anticuerpo reivindicado incluye una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-31, 49-51 y 88-97 de la SEQ ID NO: 2, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-31, 49-51 y 88-97 de la SEQ ID NO: 4, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 incluyendo los aminoácidos 27-32, 50-52 y 89-97 de la SEQ ID NO: 6, respectivamente.

Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 incluyendo los aminoácidos 27-32, 50-52 y 89-97 de la SEQ ID NO: 8, respectivamente.

El anticuerpo reivindicado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-33, 51-58 y 97-106 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y LCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-31, 49-51 y 88-97 de la SEQ ID NO: 2, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-33, 51-58 y 97-106 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y LCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-31, 49-51 y 88-97 de la SEQ ID NO: 4, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-33, 51-58 y 97-110 de la SEQ ID NO: 5, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y LCDR3 incluyendo los aminoácidos 27-32, 50-52 y 89-97 de la SEQ ID NO: 6, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-33, 51-58 y 97-110 de la SEQ ID NO: 7, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y LCDR3 incluyendo los aminoácidos 27-32, 50-52 y 89-97 de la SEQ ID NO: 8, respectivamente.

Tabla 2. Secuencias de CDR de Kabat de anticuerpos específicos contra TEM8

m825					
	SEQ ID NO: 1	Secuencia de A.A.		SEQ ID NO: 2	Secuencia de A.A.
HCDR1	26-32	GYTFSSY	LCDR1	23-33	QGDNL RDFYAS
HCDR2	52-57	IPIFGT	LCDR2	49-55	GKNRRPS
HCDR3	99-106	DTDYMFY	LCDR3	88-97	SSRDNSKHVV
m822					
	SEQ ID NO: 3	Secuencia de A.A.		SEQ ID NO: 4	Secuencia de A.A.
HCDR1	26-32	GYTFSSY	LCDR1	23-33	QGDNL RDFYAS
HCDR2	52-57	IPIFGT	LCDR2	49-55	GKNRRPS

(continuación)

m822					
HCDR3	99-106	DTDYMFYD	LCDR3	88-97	SSRDNSKHVV
m830					
	SEQ ID NO: 5	Secuencia de A.A.		SEQ ID NO: 6	Secuencia de A.A.
HCDR1	26-32	GFTFSTY	LCDR1	24-34	RASQTISRVLN
HCDR2	52-57	SNDGSN	LCDR2	50-56	AASSLQS
HCDR3	99-110	GSSWYRGWFD	LCDR3	89-97	QQTYSPPIT
m863					
	SEQ ID NO: 7	Secuencia de A.A.		SEQ ID NO: 8	Secuencia de A.A.
HCDR1	26-32	GYTFTGY	LCDR1	24-34	RASRAISRVLN
HCDR2	52-57	NPTSGS	LCDR2	50-56	AASSLQS
HCDR3	99-110	DPGSPKWLAFD	LCDR3	89-97	QQTYSPPIT

En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye CDR de Kabat, tales como las enumeradas en la Tabla 2. El anticuerpo reivindicado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-32, 52-57 y 99-106 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-32, 52-57 y 99-106 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-32, 52-57 y 99-110 de la SEQ ID NO: 5, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-32, 52-57 y 99-110 de la SEQ ID NO: 7, respectivamente.

El anticuerpo reivindicado incluye una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 incluyendo los aminoácidos 23-33, 49-55 y 88-97 de la SEQ ID NO: 2, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 incluyendo los aminoácidos 23-33, 49-55 y 88-97 de la SEQ ID NO: 4, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 incluyendo los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEQ ID NO: 6, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 incluyendo los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEQ ID NO: 8, respectivamente.

El anticuerpo reivindicado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-32, 52-57 y 99-106 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y LCDR3 incluyendo los aminoácidos 23-33, 49-55 y 88-97 de la SEQ ID NO: 2, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-32, 52-57 y 99-106 de la SEQ ID NO: 3, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y LCDR3 incluyendo los aminoácidos 23-33, 49-55 y 88-97 de la SEQ ID NO: 4, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-32, 52-57 y 99-110 de la SEQ ID NO: 5, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y LCDR3 incluyendo los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEQ ID NO: 6, respectivamente. Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una HCDR1, HCDR2 y HCDR3 incluyendo los aminoácidos 26-32, 52-57 y 99-110 de la SEQ ID NO: 7, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que incluye una LCDR1, LCDR2 y LCDR3 incluyendo los aminoácidos 24-34, 50-56 y 89-97 de la SEQ ID NO: 8, respectivamente.

En algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a la secuencia de aminoácidos expuesta como una de entre SEQ ID NO: 1 (m825VH), SEQ ID NO: 3 (m822 VH), SEQ ID NO: 5 (m830 VH) o SEQ ID NO: 7 (m863 VH). En más realizaciones de la divulgación, el anticuerpo incluye una región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a la secuencia de aminoácidos expuesta como una de entre SEQ ID NO: 2 (m825 VL), SEQ ID NO: 4 (m822 VL), SEQ ID NO: 6 (m830 VL) o SEQ ID NO: 8 (m863 VL).

En realizaciones adicionales de la divulgación, el anticuerpo incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 1 (m825 VH) y una región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 2 (m825 VL). En realizaciones adicionales de la divulgación, el anticuerpo incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 3 (m822 VH) y una región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de

aminoácidos idéntica en al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 4 (m822 VL). En realizaciones adicionales de la divulgación, el anticuerpo incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 5 (m830 VH) y una
 5 región variable de la cadena ligera que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 6 (m830 VL). En más realizaciones de la divulgación, el anticuerpo incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 7 (m863 VH) y una región variable de la cadena ligera que incluye una
 10 secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95 %, el 96 %, el 97 %, el 98 % o el 99 % a la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 8 (m863 VL).

el anticuerpo reivindicado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 1 (m825 VH). El anticuerpo reivindicado incluye una región variable de la cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 2 (m825 VL), la SEQ ID NO: 4 (m822
 15 VL).

El anticuerpo reivindicado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 1 (m825 VH) y una región variable de la cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 2 (m825 VL). Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 3 (m822 VH) y una región
 20 variable de la cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 4 (m822 VL). Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 5 (m830 VH) y una región variable de la cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 6 (m830 VL). Un anticuerpo desvelado incluye una región variable de la cadena pesada que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 7 (m863 VH) y una región
 25 variable de la cadena ligera que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 8 (m863 VL).

1. Descripción adicional de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede ser un anticuerpo humano o fragmento del mismo. También se proporcionan anticuerpos quiméricos. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno puede incluir cualquier región marco conservada adecuada, tal como (pero sin limitación) una región marco conservada humana. Se conocen en la técnica regiones marco conservadas humanas y mutaciones que pueden hacerse en las regiones marco conservadas de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 5.585.089, que se incorpora en el presente documento como referencia). Como alternativa, puede incluirse una región marco
 30 heteróloga, tal como, pero sin limitación, una región marco conservada de ratón, en la cadena pesada o ligera de los anticuerpos. (Véase, por ejemplo, Jones et al., *Nature* 321: 522, 1986; Riechmann et al., *Nature* 332: 323, 1988; Verhoeyen et al., *Science* 239: 1534, 1988; Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.* 89: 4285, 1992; Sandhu. *Crit. Rev. Biotech.* 12: 437, 1992; y Singer et al., *J. Immunol.* 150: 2844, 1993).

El anticuerpo puede ser de cualquier isotipo. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo IgM o IgG, tal como IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄. La clase de un anticuerpo que se une específicamente a TEM8 puede cambiarse por otra. En un aspecto, una molécula de ácido nucleico que codifica V_L o V_H se aísla usando procedimientos bien conocidos en la técnica, de manera que no incluya ninguna secuencia de ácido nucleico que codifique la región constante de la cadena ligera o pesada, respectivamente. En ejemplos particulares, la secuencia de aminoácidos de V_H **se establece como** la SEQ ID NO: 1. En otros ejemplos, la secuencia de aminoácidos de V_L **se establece como** la
 45 SEQ ID NO: 2. La secuencia de aminoácidos de V_H **se establece como** la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de V_L **se establece como** la SEQ ID NO: 2. Una molécula de ácido nucleico que codifica V_L o V_H entonces se une operativamente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un C_L o C_H de una clase diferente de molécula de inmunoglobulina. Esto puede conseguirse usando un vector o una molécula de ácido nucleico que comprende una cadena C_L o C_H, como se sabe en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a TEM8, que originariamente era IgM, puede cambiarse de clase a una IgG. Puede usarse el cambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, tal como de IgG₄ a IgG₂, IgG₃ o IgG₄.

En algunos ejemplos, los anticuerpos desvelados son oligómeros de anticuerpos, tales como dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros, septámeros, octámeros, etc.

(a) Afinidad de unión

En varias realizaciones, el fragmento de unión de anticuerpo o antígeno puede unirse específicamente a la proteína TEM8 con una afinidad (por ejemplo, medida mediante K_d) de no más de 1,0 x 10⁻⁸ M, no más de 5,0 x 10⁻⁸ M, no más de 1,0 x 10⁻⁹ M, no más de 5,0 x 10⁻⁹ M, no más de 1,0 x 10⁻¹⁰ M, no más de 5,0 x 10⁻¹⁰ M o no más de 1,0 x 10⁻¹¹ M. K_d puede medirse, por ejemplo, mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RI A) realizado con la versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno usando procedimientos conocidos. En un ensayo, la afinidad de unión en solución de Fab por el antígeno se mide equilibrando Fab con una concentración mínima de antígeno
 65 marcado con (¹²⁵I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, capturando después el antígeno unido con una placa recubierta con anticuerpo anti-Fab (véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293: 865-881

(1999)). Para establecer las condiciones para el ensayo, se recubren durante la noche placas de múltiples pocillos MICROTITER® (Thermo Scientific) con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab capturador (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6) y posteriormente se bloquean con albúmina sérica bovina al 2 % (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), se mezclan [¹²⁵I]-antígeno 100 µM o 26 pM con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, coherente con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., *Cancer Res.* 57: 4593-4599 (1997)). Después, el Fab de interés se incuba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un período más largo (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcanza el equilibrio. Posteriormente, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Después, la solución se retira y la placa se lava ocho veces con polisorbato 20 al 0,1 % (TWEEN-20®) en PBS. Cuando las placas se han secado, se añaden 150 µl/pocillo de centelleador (MICROSCINT-20™; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma TOPCOUNT™ (Packard) durante diez minutos. Se eligen las concentraciones de cada Fab que proporcionan menos o igual al 20 % de la unión máxima para su uso en ensayos de unión competitiva.

En otro ensayo, K_d puede medirse usando ensayos de resonancia de plasmón superficial usando un BIACORE®-2000 o un BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N. J.) a 25 °C con chips de antígeno inmovilizado CM5 a ~10 unidades de respuesta (UR). En resumen, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIACORE®, Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, a 5 µg/ml (~0,2 µM) antes de la inyección a un caudal de 5 l/minuto para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Después de la inyección del antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no han reaccionado. Para las mediciones de cinética, se inyectan diluciones en serie de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con tensioactivo de polisorbato 20 (TWEEN-20™) al 0,05 % (PBST) a 25 °C a un caudal de aproximadamente 25 l/min. Las tasas de asociación (k_{on}) y las tasas de disociación (k_{off}) se calculan usando un modelo de unión Langmuir simple uno a uno (Software de evaluación BIACORE® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensorgramas de asociación y disociación. La constante de disociación en el equilibrio (K_d) se calcula como la relación k_{off}/k_{on} . Véase, por ejemplo, Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293: 865-881 (1999). Si la constante de asociación supera $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la constante de asociación puede determinarse usando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda de 16 nm) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-AMINCO™ serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta agitada.

(b) Anticuerpos multiespecíficos

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se incluye en un anticuerpo multiespecífico, tal como un anticuerpo biespecífico. Dichos anticuerpos multiespecíficos pueden producirse mediante procedimientos conocidos, tales como el entrecruzamiento de dos o más anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno (tales como scFv) del mismo tipo o de tipos diferentes. Los procedimientos de ejemplo de preparación de anticuerpos multiespecíficos incluyen aquellos que se describen en la Pub. PCT N.º WO2013/163427. Los agentes de entrecruzamiento adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un separador apropiado (tal como éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncional (tal como suberato de disuccinimidilo). Dichos enlazadores están disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, 111.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se incluye en un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a la proteína TEM8 y adicionalmente se une específicamente a CD3. Se conocen ejemplos de dominios de unión a CD3 que pueden incluirse en el anticuerpo biespecífico o fragmento de unión a antígeno e aquellos que se desvelan en la Pub. PCT N.º WO2013/163427.

Se conocen diversos tipos de anticuerpos multiespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos monocatenarios pueden ser codificados por una única molécula de ácido nucleico. En la técnica se conocen ejemplos de anticuerpos biespecíficos monocatenarios, así como procedimientos para construir dichos anticuerpos (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 8.076.459, 8.017.748, 8.007.796, 7.919.089, 7.820.166, 7.635.472, 7.575.923, 7.435.549, 7.332.168, 7.323.440, 7.235.641, 7.229.760, 7.112.324, 6.723.538, que se incorporan como referencia en el presente documento). Pueden encontrarse ejemplos adicionales de anticuerpos biespecíficos monocatenarios en la solicitud PCT N.º WO 99/54440; Mack, *J. Immunol.*, 158: 3965-3970, 1997; Mack, *PNAS*, 92: 7021-7025, 1995; Kufer, *Cancer Immunol. Immunother.*, 45: 193-197, 1997; Löffler, *Blood*, 95: 2098-2103, 2000; y Bruhl, *J. Immunol.*, 166: 2420-2426, 2001. Se describe la producción de moléculas biespecíficas Fab-scFv ("bicuerpo"), por ejemplo, en Schoonjans et al. (*J. Immunol.* 165: 7050-57, 2000) y Willems et al. (*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 786: 161-76, 2003). Para los bicuerpos, una molécula scFv puede fusionarse con una de las cadenas VL-CL (L) o VH-CH1, por ejemplo, para producir un bicuerpo, un scFv se fusiona con el extremo C-terminal de una cadena Fab.

(c) Fragmentos

La presente divulgación abarca fragmentos de unión a antígeno, tales como Fab, F(ab')₂ y Fv que incluyen una región variable de la cadena pesada y la cadena ligera y se unen específicamente a la proteína TEM8. Estos fragmentos de anticuerpos conservan la capacidad de unirse selectivamente con el antígeno y son fragmentos de

"unión a antígeno". Estos fragmentos incluyen:

(1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, puede producirse mediante digestión de anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;

(2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo puede obtenerse tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo;

(3) (Fab')₂, el fragmento de anticuerpo puede obtenerse mediante tratamiento del anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' unidos por dos enlaces disulfuro;

(4) Fv, un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; y

(5) Anticuerpo monocatenario (tal como scFv), definido como una molécula modificada por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera, la región variable de la cadena pesada, unida por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria genéticamente fusionada. Un scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de la cadena ligera de una inmunoglobulina y una región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina están unidas por un enlazador (véase, por ejemplo, Ahmad et al., *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, doi: 10.1155/2012/980250; Marbry, *IDrugs*, 13: 543-549, 2010). La orientación intramolecular del dominio V_H y el dominio V_L en un scFv, no es decisiva para los anticuerpos proporcionados (por ejemplo, para los anticuerpos multiespecíficos proporcionados). Por tanto, pueden usarse scFv con ambas disposiciones posibles (V_H-dominio-enlazador dominio-V_L-dominio; V_L-dominio-enlazador dominio-V_H-dominio).

(6) Un dímero de un anticuerpo monocatenario (scFv)₂, definido como un dímero de un scFv. Esto también se ha denominado un "minianticuerpo".

Se conocen en la técnica procedimientos de preparación de estos fragmentos (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 2ª, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 2013).

En un grupo adicional de realizaciones, el fragmento de unión al anticuerpo puede ser un anticuerpo Fv, que normalmente tiene aproximadamente 25 kDa y contiene un sitio de unión a antígeno completo con tres CDR por cada cadena pesada y cada cadena ligera. Para producir anticuerpos Fv, el V_H y el V_L pueden expresarse a partir de dos construcciones de ácido nucleico individuales en una célula hospedadora. Si el V_H y el V_L se expresan de forma no contigua, las cadenas del anticuerpo Fv normalmente se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes. Sin embargo, estas cadenas tienden a disociarse tras la dilución, por lo que se han desarrollado procedimientos para entrecruzar las cadenas a través de glutaraldehído, disulfuros intermoleculares o un enlazador peptídico. Por tanto, en un ejemplo, el Fv puede ser un Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), en donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera están químicamente unidas mediante enlaces disulfuro.

En un ejemplo adicional, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno monocatenarias (scFv) se preparan construyendo una molécula de ácido nucleico que codifica los dominios V_H y V_L conectados por un oligonucleótido. La molécula de ácido nucleico se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula hospedadora tal como una célula de mamífero. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Se conocen en la técnica procedimientos para producir scFv (véase Whitlow et al., *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, página 97, 1991; Bird et al., *Science* 242: 423, 1988; Patente de los EE.UU. N.º 4.946.778; Pack et al., *Bio/Technology* 11: 1271, 1993; Ahmad et al., *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, doi: 10.1155/2012/980250; Marbry, *IDrugs*, 13: 543-549, 2010). También se contemplan dímeros de un anticuerpo monocatenario (scFv)₂.

Los fragmentos de unión a antígeno pueden prepararse mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en una célula hospedadora (tal como una célula de *E. coli*) de ADN que codifica el fragmento. También pueden obtenerse fragmentos de unión a antígeno mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante procedimientos convencionales. Por ejemplo, pueden producirse fragmentos de unión a antígeno mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3,5S. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente (véase la Patente de los EE.UU. N.º 4.036.945 y la Patente de los EE.UU. N.º 4.331.647 y las referencias contenidas en el mismo; Nisonhoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89: 230, 1960; Porter, *Biochem. J.* 73: 119, 1959; Edelman et al., *Methods in Enzymology*, Vol. 1, página 422, Academic Press, 1967; y Coligan et al. en las secciones 2.8.1-2.8.10 y 2.10.1-2.10.4).

También pueden usarse otros procedimientos para escindir anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadenas ligeras y pesadas, la escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

También se han identificado dominios V_H únicos de unión a antígeno, denominados anticuerpos de dominio (dAb), a partir de una biblioteca de genes de V_H murino amplificados a partir de ADN genómico de ratones inmunizados (Ward et al. *Nature* 341: 544-546, 1989). También se han descrito polipéptidos de dominio variable de inmunoglobulina humana capaces de unirse al antígeno con alta afinidad (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N.º WO 2005/035572 y WO 2003/002609). Las CDR que se desvelan en el presente documento también pueden incluirse en un dAb.

En algunas realizaciones, se expresa una o más de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada y/o ligera (CDR) de un anticuerpo desvelado en la superficie de otra proteína, tal como una proteína de armazón. La expresión de dominios de anticuerpos en la superficie de una proteína de armazón es conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Liu et al., *J. Virology* 85 (17): 8467-8476, 2011). Dicha expresión crea una proteína quimérica que conserva la unión a TEM8. En algunas realizaciones específicas, una o más de las CDR de la cadena pesada se injertan en una proteína de armazón, tal como una o más de entre CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena pesada. También pueden incluirse una o más CDR en un diacuerpo u otro tipo de molécula de anticuerpo monocatenario.

(d) Variantes

En determinadas realizaciones, se contemplan variantes de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Pueden prepararse variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo mediante la introducción de modificaciones apropiadas en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, supresiones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Puede efectuarse cualquier combinación de supresión, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, a condición de que la construcción final posea las características deseadas, por ejemplo, unión a antígeno.

En determinadas realizaciones, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una o más sustituciones de aminoácidos. Los sitios de interés para la mutagénesis por sustitución incluyen las CDR y las regiones marco conservadas. Pueden introducirse sustituciones de aminoácidos en un anticuerpo de interés y los productos pueden explorarse para detectar una actividad deseada, por ejemplo, unión a antígeno conservada/mejorada, inmunogenia reducida o CCDA o CDC mejoradas.

Las variantes normalmente mantienen los restos de aminoácidos necesarios para el correcto plegamiento y estabilización entre las regiones V_H y V_L , y mantendrán las características de carga de los restos con el fin de conservar el pI bajo y la toxicidad baja de las moléculas. Pueden hacerse sustituciones de aminoácidos en las regiones V_H y V_L para aumentar el rendimiento. Las tablas de sustituciones de aminoácidos conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas por un experto habitual en la materia. Los siguientes seis grupos son ejemplos de aminoácidos que se consideran sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparragina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

En algunas realizaciones, la cadena pesada del anticuerpo incluye hasta 10 (tal como hasta 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8 o hasta 9) sustituciones de aminoácidos (tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos) en comparación con la secuencia de aminoácidos establecida como una de entre las SEQ ID NO: 1, 3, 5 o 7. En algunas realizaciones, la cadena ligera del anticuerpo incluye hasta 10 (tal como hasta 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8 o hasta 9) sustituciones de aminoácidos (tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos) en comparación con la secuencia de aminoácidos establecida como una de entre las SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede incluir hasta 10 (tal como hasta 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8 o hasta 9) sustituciones de aminoácidos (tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos) en las regiones marco conservadas de la cadena pesada del anticuerpo o la cadena ligera del anticuerpo, o las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, en comparación con una región marco conservada conocida o en comparación con las regiones marco conservadas de los anticuerpos m825, m822, m830 o m863 como se desvelan en el presente documento y mantienen la actividad de unión específica para

la proteína TEM8.

En determinadas realizaciones, pueden producirse sustituciones, inserciones o supresiones dentro de una o más CDR siempre que dichas alteraciones no reduzcan sustancialmente la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno. Por ejemplo, pueden hacerse alteraciones conservadoras (por ejemplo, sustituciones conservadoras como se proporcionan en el presente documento) que no reduzcan sustancialmente la afinidad de unión en las CDR. En determinadas realizaciones de las secuencias de V_H y V_L variantes proporcionadas anteriormente, cada CDR está inalterada o no contiene más de una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.

Para aumentar la afinidad de unión del anticuerpo, los segmentos V_L y V_H pueden mutarse aleatoriamente, tal como dentro de la región H-CDR3 o la región L-CDR3, en un procedimiento análogo al proceso de mutación somática *in vivo* responsable de la maduración de la afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmunitaria natural. Por tanto, la maduración de la afinidad *in vivo* puede lograrse amplificando las regiones V_H y V_L usando cebadores de PCR complementarios a H-CDR3 o L-CDR3, respectivamente. En este procedimiento, los cebadores se han "enriquecido" con una mezcla aleatoria de las cuatro bases de nucleótidos en determinadas posiciones, de manera que los productos de PCR resultantes codifican segmentos V_H y V_L en los que se han introducido mutaciones aleatorias en las regiones de la CDR3 V_H y/o V_L. Estos segmentos V_H y V_L mutados aleatoriamente pueden someterse a ensayo para determinar la afinidad de unión para la proteína TEM8. La secuencia de aminoácidos de V_H es la SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de V_L es la SEQ ID NO: 2. Se conocen procedimientos de maduración de la afinidad *in vitro* (véase, por ejemplo, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207: 179-196 (2008)) y Hoogenboom et al. en *Methods in Molecular Biology* 178: 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J., (2001)).

Un procedimiento útil para la identificación de restos o regiones de un anticuerpo que pueden usarse como diana para mutagénesis se denomina "mutagénesis por rastreo de alanina" como se describe por Cunningham y Wells (1989) *Science*, 244: 1081-1085. En este procedimiento, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (por ejemplo, alanina o polialanina) para determinar si la interacción del anticuerpo con el antígeno se ve afectada. Pueden introducirse sustituciones adicionales en las ubicaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones iniciales. Como alternativa o adicionalmente, se usa una estructura cristalina de un complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos pueden usarse como diana o eliminarse como candidatos para sustitución. Las variantes pueden explorarse para determinar si contienen las propiedades deseadas.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se altera para aumentar o disminuir el grado en que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se glucosila. La adición o supresión de sitios de glucosilación puede lograrse convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de manera que se creen o se retiren uno o más sitios de glucosilación.

Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, el hidrato de carbono unido a esta puede alterarse. Los anticuerpos naturales producidos por células de mamífero comprenden normalmente un oligosacárido biantenarico, ramificado, que generalmente está unido por un enlace N a Asn297 del dominio CH₂ de la región Fc. Véase, por ejemplo, Wright et al. *TIBTECH* 15: 26-32 (1997). El oligosacárido puede incluir diversos hidratos de carbono, por ejemplo, manosa, N-acetil glucosamina (GlcNAc), galactosa y ácido siálico, así como una fucosa unida a un GlcNAc en el "tallo" de la estructura del oligosacárido biantenarico. En algunas realizaciones, pueden hacerse modificaciones del oligosacárido en un anticuerpo con el fin de crear variantes de anticuerpo con determinadas propiedades mejoradas.

En una realización, se proporcionan variantes de anticuerpos que tienen una estructura de hidrato de carbono que carece de fucosa unida (directa o indirectamente) a una región Fc. Por ejemplo, la cantidad de fucosa en dicho anticuerpo puede ser del 1 % al 80 %, del 1 % al 65 %, del 5 % al 65 % o del 20 % al 40 %. La cantidad de fucosa se determina calculando la cantidad promedio de fucosa dentro de la cadena de azúcar en Asn297, con respecto a la suma de todas las glucoestructuras unidas a Asn 297 (por ejemplo, estructuras complejas, híbridas y con alto contenido de manosa) según se mide mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, como se describe en el documento WO 2008/077546, por ejemplo. Asn297 se refiere al resto de asparragina ubicado aproximadamente en la posición 297 en la región Fc; sin embargo, Asn297 también puede ubicarse aproximadamente ± 3 aminoácidos corriente arriba o corriente abajo de la posición 297, es decir, entre las posiciones 294 y 300, debido a variaciones de secuencia menores en los anticuerpos. Dichas variantes de fucosilación pueden tener una función de CCDA mejorada. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de los EE.UU. N.º US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los ejemplos de publicaciones relacionadas con variantes de anticuerpos "defucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: el documento US 2003/0157108; el documento WO 2000/61739; el documento WO 2001/29246; el documento US 2003/0115614; el documento US 2002/0164328; el documento US 2004/0093621; el documento US 2004/0132140; el documento US 2004/0110704; el documento US 2004/0110282; el documento US 2004/0109865; el documento WO 2003/085119; el documento WO 2003/084570; el documento WO 2005/035586; el documento WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004). Los ejemplos de estirpes celulares capaces de producir anticuerpos defucosilados incluyen células Lee 13 CHO deficientes en fucosilación de

proteínas (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249: 533-545 (1986); la Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 2003/0157108 A1, Presta, L.; y el documento WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el Ejemplo 11) y estirpes celulares inactivadas, tales como las células CHO inactivadas para el gen de la alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8 (véase, por ejemplo, Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94 (4): 680-688 (2006); y el documento WO2003/085107).

Se proporcionan adicionalmente variantes de anticuerpos con oligosacáridos biseccionados, por ejemplo, en los que un oligosacárido biantenarío unido a la región Fc del anticuerpo se bisecciona mediante GlcNAc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una fucosilación reducida y/o una función de CCDA mejorada. Se describen ejemplos de dichas variantes de anticuerpos, por ejemplo, en el documento WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); la Pat. de los EE.UU. N.º 6.602.684 (Umana et al.); y el documento US 2005/0123546 (Umana et al.). También se proporcionan variantes de anticuerpos con al menos un resto de galactosa en el oligosacárido unido a la región Fc. Dichas variantes de anticuerpos pueden tener una función de CDC mejorada. Dichas variantes de anticuerpos se describen, por ejemplo, en el documento WO 1997/30087 (Patel et al.); el documento WO 1998/58964 (Raju, S.); y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.).

En varias realizaciones, la región constante del anticuerpo incluye una o más sustituciones de aminoácidos para optimizar la semivida *in vivo* del anticuerpo. La semivida en suero de los Ab IgG es regulada por el receptor Fc neonatal (FcRn). Por tanto, en varias realizaciones, el anticuerpo incluye una sustitución de aminoácidos que aumenta la unión al FcRn. El experto en la materia conoce varias de estas sustituciones, tales como las sustituciones en las regiones constantes de IgG T250Q y M428L (véase, por ejemplo, Hinton et al., *J Immunol.*, 176: 346-356, 2006); M428L y N434S (la mutación "LS", véase, por ejemplo, Zalevsky, et al., *Nature Biotechnology*, 28: 157-159, 2010); N434A (véase, por ejemplo, Petkova et al., *Int. Immunol.*, 18: 1759-1769, 2006); T307A, E380A y N434A (véase, por ejemplo, Petkova et al., *Int. Immunol.*, 18: 1759-1769, 2006); y M252Y, S254T y T256E (véase, por ejemplo, Dall'Acqua et al., *J. Biol. Chem.*, 281: 23514-23524, 2006).

En algunas realizaciones, la región constante del anticuerpo incluye una o más sustituciones de aminoácidos para optimizar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). La CCDA está mediada principalmente a través de un conjunto de receptores Fcγ estrechamente relacionados. En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye una o más sustituciones de aminoácidos que aumentan la unión a FcγRIIIa. El experto en la materia conoce varias de estas sustituciones, tales como las sustituciones en las regiones constantes de IgG S239D y I332E (véase, por ejemplo, Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103: 4005-4010, 2006); y S239D, A330L y I332E (véase, por ejemplo, Lazar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103: 4005-4010, 2006).

También se incluyen combinaciones de las sustituciones anteriores, para generar una región constante de IgG con una unión aumentada a FcRn y FcγRIIIa. Las combinaciones aumentan la semivida de los anticuerpos y la CCDA. Por ejemplo, dicha combinación incluye anticuerpos con la siguiente sustitución de aminoácidos en la región Fc:

- (1) S239D/I332E y T250Q/M428L;
- (2) S239D/I332E y M428L/N434S;
- (3) S239D/I332E y N434A;
- (4) S239D/I332E y T307A/E380A/N434A;
- (5) S239D/I332E y M252Y/S254T/T256E;
- (6) S239D/A330L/I332E y T250Q/M428L;
- (7) S239D/A330L/I332E y M428L/N434S;
- (8) S239D/A330L/I332E y N434A;
- (9) S239D/A330L/I332E y T307A/E380A/N434A; o
- (10) S239D/A330L/I332E y M252Y/S254T/T256E.

En algunos ejemplos, los anticuerpos, o un fragmento de unión a antígeno de los mismos, se modifican de manera que sean directamente citotóxicos para las células infectadas o usen defensas naturales tales como el complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o la fagocitosis por macrófagos.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo proporcionado en el presente documento puede modificarse adicionalmente para que contenga restos no proteínicos adicionales que son conocidos en la técnica y están fácilmente disponibles. Los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo incluyen, pero sin limitación, polímeros hidrosolubles. Los ejemplos no limitantes de polímeros hidrosolubles incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de prolipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), alcohol polivinílico y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular y puede ser ramificado o no ramificado. La cantidad de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se une más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o el tipo de polímeros utilizados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades

o funciones particulares del anticuerpo que ha de mejorarse, si el derivado de anticuerpo se usará en una terapia en condiciones definidas, etc.

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede derivatizarse o unirse a otra molécula (tal como otro péptido o proteína). En general, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se derivatiza de manera que la unión a TEM8 no se vea afectada negativamente por la derivatización o el marcaje. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede unirse funcionalmente (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un marcador detectable, una molécula efectora o una proteína o péptido que pueda mediar la asociación del anticuerpo o porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o un marcador de polihistidina).

También se incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo en TEM8 al que se unen los anticuerpos específicos contra TEM8 que se proporcionan en el presente documento. Pueden identificarse anticuerpos que se unen a dicho epítipo basándose en su susceptibilidad de competencia cruzada (por ejemplo, para inhibir competitivamente la unión, de una manera estadísticamente significativa) con los anticuerpos específicos contra TEM8 que se proporcionan en el presente documento en ensayos de unión a TEM8 (tales como aquellos que se describen en los Ejemplos). Un anticuerpo "compite" por la unión cuando el anticuerpo competidor inhibe la unión a TEM8 de un anticuerpo de la invención en más del 50 %, en presencia de concentraciones de anticuerpos competidores superiores a $10^6 \times K_D$ del anticuerpo competidor. En una determinada realización, el anticuerpo que se une al mismo epítipo en TEM8 que los anticuerpos de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano. Dichos anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse y aislarse como se describe en el presente documento.

B. Conjugados

Los anticuerpos monoclonales humanos específicos para TEM8 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, pueden conjugarse con un agente, tal como una molécula efectora o marcador detectable, usando cualquier número de medios conocidos por los expertos en la materia. Pueden usarse medios de unión tanto covalentes como no covalentes. Los conjugados incluyen, pero sin limitación, moléculas en las que existe un enlace covalente de una molécula efectora o un marcador detectable a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a TEM8. Un experto en la materia apreciará que pueden usarse diversas moléculas efectoras y marcadores detectables, incluyendo (pero sin limitación) agentes quimioterápicos, agentes antiangiogénicos, toxinas, agentes radiactivos tales como ^{125}I , ^{32}P , ^{14}C , ^3H y ^{35}S y otros marcadores, restos diana y ligandos, etc.

La elección de una molécula efectora o marcador detectable particular depende de la molécula o célula diana particular y del efecto biológico deseado. Por tanto, por ejemplo, la molécula efectora puede ser una citotoxina que se use para provocar la muerte de una célula diana particular (tal como una célula tumoral).

Las moléculas efectoras y los marcadores detectables pueden unirse a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de interés usando cualquier número de medios conocidos por los expertos en la materia. Pueden usarse medios de unión tanto covalentes como no covalentes. El procedimiento para unir una molécula efectora o marcador detectable a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno varía de acuerdo con la estructura química del efector. Los polipéptidos normalmente contienen una diversidad de grupos funcionales; tales como grupos ácido carboxílico (COOH), amina libre ($-\text{NH}_2$) o sulfhidrilo ($-\text{SH}$), que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado en un anticuerpo para dar como resultado la unión de la molécula efectora o marcador detectable. Como alternativa, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se derivatiza para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de un número de moléculas enlazadoras conocidas, tales como las disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford, IL. El enlazador puede ser cualquier molécula utilizada para unir el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a la molécula efectora o marcador detectable. El enlazador es capaz de formar enlaces covalentes tanto con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como con la molécula efectora o marcador detectable. Los enlazadores adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, enlazadores de carbono de cadena lineal o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos o enlazadores peptídicos. Cuando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y la molécula efectora o marcador detectable son polipéptidos, los enlazadores pueden unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (tal como a través de un enlace disulfuro a cisteína) o a los grupos carbono amino y carboxilo alfa de los aminoácidos terminales.

Adicionalmente, en varias realizaciones, el enlazador puede incluir un elemento espaciador, que, cuando está presente, aumenta el tamaño del enlazador de manera que aumente la distancia entre la molécula efectora o el marcador detectable y el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. El experto habitual conoce espaciadores de ejemplo e incluyen aquellos enumerados en las Patentes de los EE.UU. N.º 7.964.5667, 498.298, 6.884.869, 6.323.315, 6.239.104, 6.034.065, 5.780.588, 5.665.860, 5.663.149, 5.635.483, 5.599.902, 5.554.725, 5.530.097, 5.521.284, 5.504.191, 5.410.024, 5.138.036, 5.076.973, 4.986.988, 4.978.744, 4.879.278, 4.816.444 y 4.486.414, así como las Pub. de Patente de los EE.UU. N.º 20110212088 y 20110070248.

Por tanto, en varias realizaciones, el conjugado incluye un enlazador que conecta la molécula efectora o marcador

detectable al anticuerpo específico de TEM8 o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, el enlazador es escindible en condiciones intracelulares, de manera que la escisión del enlazador libera la molécula efectora o marcador detectable del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en el entorno intracelular. En otras realizaciones más, el enlazador no es escindible y la molécula efectora o marcador detectable se libera, por ejemplo, mediante degradación de anticuerpos. En algunas realizaciones, el enlazador puede escindirse mediante un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador peptídico que es escindido por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo, pero sin limitación, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunas realizaciones, el enlazador peptídico tiene al menos dos aminoácidos de longitud o al menos tres aminoácidos de longitud. Sin embargo, el enlazador puede tener 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos de longitud, tal como 1-2, 1-3, 2-5, 3-10, 3-15, 1-5, 1-10, 1-15, aminoácidos de longitud. Las proteasas pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todas las cuales se sabe que hidrolizan derivados de fármacos dipeptídicos que dan como resultado la liberación de fármacos activos dentro de las células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83: 67-123). Por ejemplo, puede usarse un enlazador peptídico que es escindible por la proteasa catepsina B dependiente de tiol, (por ejemplo, un enlazador fenilalanina-leucina o un enlazador glicina-fenilalanina -leucina-glicina). Otros ejemplos de dichos enlazadores se describen, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 6.214.345. En una realización específica, el enlazador peptídico escindible por una proteasa intracelular es un enlazador Valina-Citrulina o un enlazador Fenilalanina-Lisina (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el enlazador Valina-Citrulina).

En otras realizaciones, el enlazador escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a determinados valores de pH. Normalmente, el enlazador sensible al pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil al ácido que es hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetol o similares). (Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83: 67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.* 264: 14653-14661). Dichos enlazadores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como las de la sangre, pero son inestables a un pH inferior a 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En determinadas realizaciones, el enlazador hidrolizable es un enlazador de tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico a través de un enlace de acilhidrazona (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.622.929).

En otras realizaciones más, el enlazador es escindible en condiciones reductoras (por ejemplo, un enlazador disulfuro). En la técnica se conoce una diversidad de enlazadores disulfuro, incluyendo, por ejemplo, aquellos que pueden formarse usando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridilditio)tolueno)-, SPDB y SMPT. (Véase, por ejemplo, Thorpe et al., 1987, *Cancer Res.* 47: 5924-5931; Wawrzynczak et al., En *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987); Phillips et al., *Cancer Res.* 68: 92809290, 2008). Véase también la Patente de los EE.UU. N.º 4.880.935.)

En otras realizaciones específicas, el enlazador es un enlazador de malonato (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.* 15: 1387-93), un enlazador de maleimidobenzoílo (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3 (10): 1299-1304) o un análogo de 3'-N-amida (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3 (10): 1305-12).

En otras realizaciones más, el enlazador no es escindible y la molécula efectora o marcador detectable se libera mediante degradación de anticuerpos. (Véase la Publicación de los EE.UU. N.º 2005/0238649).

En varias realizaciones, el enlazador es resistente a la escisión en un entorno extracelular. Por ejemplo, no más de aproximadamente el 20 %, no más de aproximadamente el 15 %, no más de aproximadamente el 10 %, no más de aproximadamente el 5 %, no más de aproximadamente el 3 % o no más de aproximadamente el 1 % de los enlazadores, en una muestra de conjugado, se escinde cuando el conjugado está presente en un entorno extracelular (por ejemplo, en plasma). Puede determinarse si un enlazador es o no resistente a la escisión en un entorno extracelular, por ejemplo, incubando el conjugado que contiene el enlazador de interés con plasma durante un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y después cuantificando la cantidad de molécula efectora o marcador detectable libre presente en el plasma. Se describe una diversidad de enlazadores de ejemplo que pueden usarse en conjugados en el documento WO 2004-010957, la Publicación de los EE.UU. N.º 2006/0074008, la Publicación de los EE.UU. N.º 20050238649 y la Publicación de los EE.UU. N.º 2006/0024317.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se desvelan en el presente documento pueden derivatizarse, por ejemplo, mediante el entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, tal como para crear anticuerpos biespecíficos). Los agentes de entrecruzamiento adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos claramente reactivos separados por un separador apropiado (tal como éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncional (tal como suberato de disuccinimidilo). Dichos enlazadores están disponibles en el mercado.

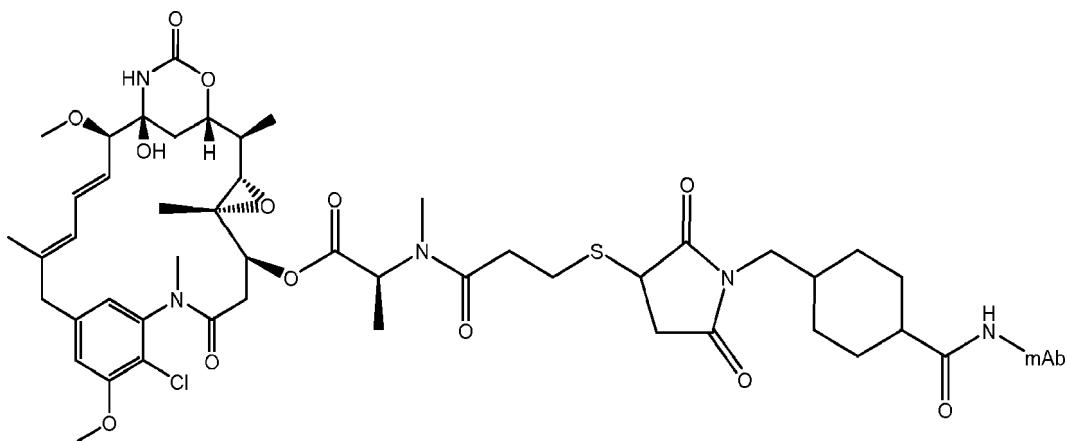
En vista de la gran cantidad de procedimientos que se han publicado para unir una diversidad de compuestos

radiodiagnósticos, compuestos radioterápicos, marcadores (tales como enzimas o moléculas fluorescentes), toxinas y otros agentes a anticuerpos, un experto en la materia podrá determinar un procedimiento adecuado para unir un agente dado a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno u otro polipéptido. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede conjugarse con fármacos de bajo peso molecular tales como Monometil Auristatina E (MMAE), Monometil Auristatina F (MMAF), maitansina, derivados de maitansina, incluyendo el derivado de maitansina conocido como DM1 (también conocido como mertansina) u otros agentes quimioterápicos para preparar un conjugado anticuerpo-fármaco (CAF). En varias realizaciones, pueden conjugarse diversos agentes quimioterápicos que se describen en el presente documento con los anticuerpos proporcionados para generar un conjugado.

En varias realizaciones, se proporcionan conjugados de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como una calicamicina, maitansinoides, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

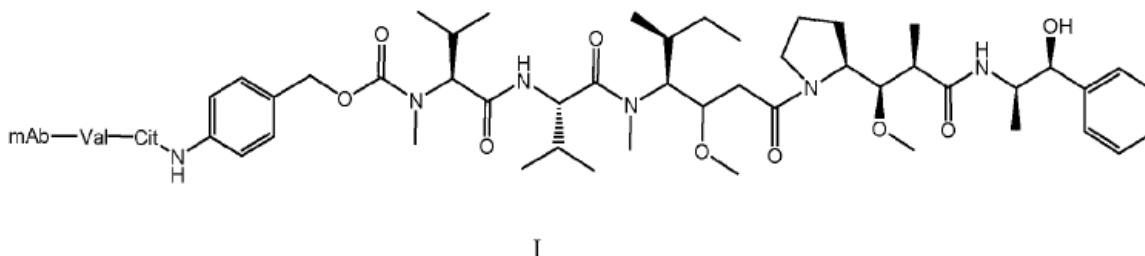
Los compuestos de maitansina adecuados para su uso como restos de toxina maitansinoide son bien conocidos en la técnica y pueden aislarse de fuentes naturales de acuerdo con procedimientos conocidos, pueden producirse usando técnicas de ingeniería genética (véase Yu et al (2002) *PNAS* 99: 7968-7973) o puede prepararse maitansinol y análogos de maitansinol sintéticamente de acuerdo con procedimientos conocidos. Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (Patente de los EE.UU. N.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como el maitansinol y los ésteres de C-3 maitansinol (Patente de los EE.UU. N.º 4.151.042). Se desvela maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. N.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533. Se desvelan conjugados que contienen maitansinoides, procedimientos para prepararlos y su uso terapéutico, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. N.º 5.208.020; 5.416.064; 6.441.163 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1.

En un ejemplo, el conjugado incluye un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a TEM8 (o al fragmento de unión a antígeno del mismo), un enlazador de tioéster no reducible y la toxina maitansinoide DM1; por ejemplo, el conjugado puede incluir la estructura expuesta como (en donde "mAb" se refiere al anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo):

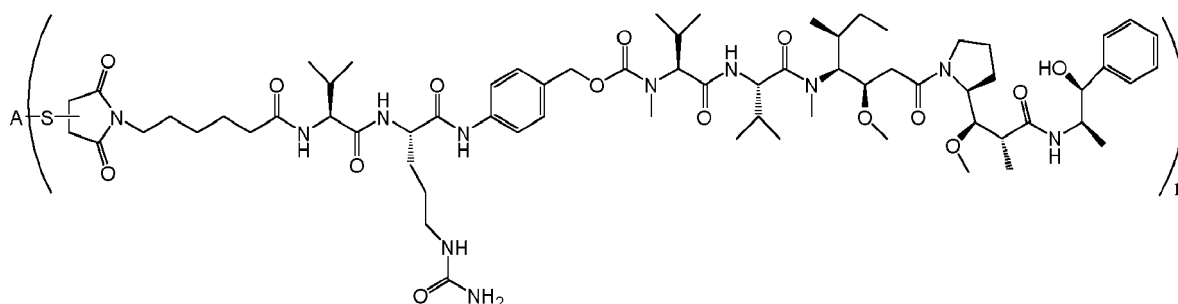


En algunas realizaciones, la molécula efectora es una auristatina, tal como auristatina E (también conocida en la técnica como derivado de dolastatina-10) o un derivado de la misma. La auristatina puede ser, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar auristatina E con ácido paraacetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otras auristatinas de ejemplo incluyen AFP, MMAF, y MMAE. La síntesis y la estructura de auristatinas de ejemplo se describen en la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 2003/0083263; la Publicación de Patente Internacional N.º WO 04/010957, la Publicación de Patente Internacional N.º WO 02/088172 y las Patentes de los EE.UU. N.º 7.498.298, 6.884.869, 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414. Se proporciona una descripción adicional de conjugados fármaco-anticuerpo que incluye la auristatina MMAE y procedimientos de preparación de dichos conjugados en, por ejemplo, las Publicaciones de los EE.UU. N.º 2011/0268751, 2008/0305044, 2007/0258987). Se ha demostrado que las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos y la división nuclear y celular y tienen actividad antineoplásica. Las auristatinas se unen a la tubulina y pueden ejercer un efecto citotóxico o citostático en las células. Existen varios ensayos diferentes, conocidos en la técnica, que pueden usarse para determinar si una auristatina o un conjugado resultante ejerce un efecto citostático o citotóxico en una estirpe celular deseada.

En un ejemplo, el conjugado incluye un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a TEM8 (o al fragmento de unión a antígeno del mismo), un enlazador escindible que incluye un sitio de escisión del péptido Valina-Citrulina (Val-Cit), un espaciador y la toxina MMAE; por ejemplo, el conjugado puede incluir la estructura expuesta como (en donde "mAb" se refiere al anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo):

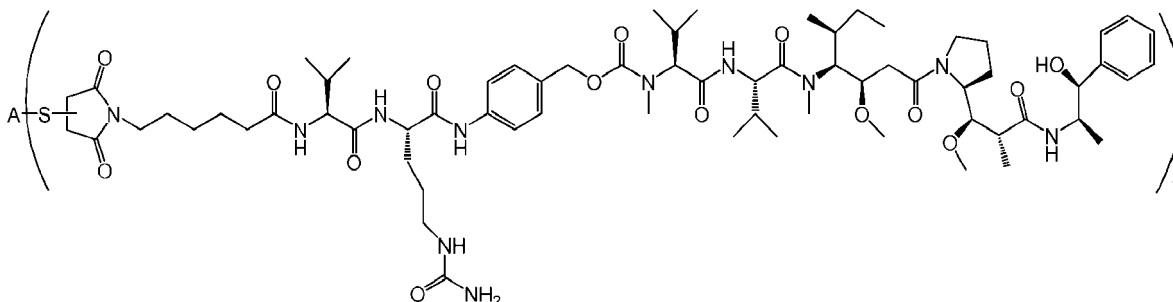


En una realización preferida, el conjugado puede ser



donde n es un número entero (tal como un número entero par) de 0 a 10 (tal como de 0 a 8, de 0 a 4, de 2 a 4, de 2 a 8, de 1 a 10, de 1 a 8 o de 1 a 4, o 2, 4, 6 u 8), A es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una región determinante de complementariedad de la cadena pesada (H-CDR)1, una H-CDR2 y una H-CDR3 que comprenden los aminoácidos 26-33, 51-58 y 97-106 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que comprende una región determinante de complementariedad de la cadena ligera (L-CDR)1, una L-CDR2 y una L-CDR3 que comprenden los aminoácidos 26-31, 49-51 y 88-97 de la SEQ ID NO: 2, respectivamente, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a TEM8 y S es un átomo de azufre del anticuerpo. En una realización, n es preferentemente un número entero par de 0 a 8, preferentemente de 0 a 4. El resto S puede exponerse mediante reducción o reducción parcial de los disulfuros entre cadenas del anticuerpo (por ejemplo, mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT o TCEP).

En una realización no limitante, el conjugado puede ser



donde n es 4 y A es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una región determinante de complementariedad de la cadena pesada (H-CDR)1, una H-CDR2 y una H-CDR3 que comprenden los aminoácidos 26-33, 51-58 y 97-106 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que comprende una región determinante de complementariedad de la cadena ligera (L-CDR)1, una L-CDR2 y una L-CDR3 que comprenden los aminoácidos 26-31, 49-51 y 88-97 de la SEQ ID NO: 2, respectivamente, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a TEM8. En algunas de dichas realizaciones, la región variable de la cadena pesada

comprende la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 1 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 2, y S es un átomo de azufre del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

- 5 Pueden emplearse toxinas adicionales con anticuerpos que se unen específicamente a TEM8 y al fragmento de unión a antígeno de estos anticuerpos. Las toxinas de ejemplo incluyen exotoxina de *Pseudomonas* (PE), ricina, abrina, toxina diftérica y subunidades de la misma, ribotoxina, ribonucleasa, saporina y calicamicina, así como las toxinas botulínicas A a F. Estas toxinas son bien conocidas en la técnica y muchas están fácilmente disponibles en fuentes comerciales (por ejemplo, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO). Las toxinas contempladas también incluyen variantes de las toxinas (véanse, por ejemplo, véase, las Patentes de los EE.UU. N.º 5.079.163 y 10 4.689.401). En algunas realizaciones, estos conjugados se usan para el tratamiento de un carcinoma, por ejemplo, un carcinoma de mama, carcinoma colorrectal, carcinoma de pulmón y melanoma.

- 15 La saporina es una toxina derivada de *Saponaria officinalis* que interrumpe la síntesis de proteínas mediante la inactivación de la porción 60S del complejo ribosómico (Stirpe et al., *Bio/Technology*, 10: 405-412, 1992). Sin embargo, la toxina no tiene mecanismo para la entrada específica en las células y, por tanto, requiere conjugación con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que reconozca una proteína de la superficie celular que se internalice con el fin de que las células la capten eficientemente.

- 20 La toxina diftérica se aísla de *Corynebacterium diphtheriae*. Normalmente, la toxina diftérica para su uso en inmunotoxinas se muta para reducir o para eliminar la toxicidad no específica. Un mutante conocido como CRM107, que tiene una actividad enzimática completa pero una toxicidad inespecífica notablemente reducida, se conoce desde la década de 1970 (Laird y Groman, *J. Virol.* 19: 220, 1976) y se ha utilizado en ensayos clínicos en seres humanos. Véanse, la Patente de los EE.UU. N.º 5.792.458 y la Patente de los EE.UU. N.º 5.208.021.

- 25 La ricina es la lectina RCA60 de *Ricinus communis* (ricino). Para obtener ejemplos de ricina, véanse, la Patente de los EE.UU. N.º 5.079.163 y la Patente de los EE.UU. N.º 4.689.401. La aglutinina de *Ricinus communis* (RCA) aparece en dos formas denominadas RCA₆₀ y RCA₁₂₀ de acuerdo con sus pesos moleculares de aproximadamente 65 y 120 kD, respectivamente (Nicholson y Blaustein, *J. Biochim. Biophys. Acta* 266: 543, 1972). La cadena A es responsable de inactivar la síntesis de proteínas y destruir las células. La cadena B une la ricina a los restos de galactosa de la superficie celular y facilita el transporte de la cadena A dentro del citosol (Olsnes et al., *Nature* 249: 627-631, 1974 y la Patente de los EE.UU. N.º 3.060.165).

- 30 También se han conjugado ribonucleasas con moléculas de direccionamiento para su uso como inmunotoxinas (véase Suzuki et al., *Nat. Biotech.* 17: 265-70, 1999). Se analizan ejemplos de ribotoxinas tales como α -sarcina y restrictocina, por ejemplo, en Rathore et al., *Gene* 190: 31-5, 1997; y Goyal y Batra, *Biochem.* 345 Parte 2: 247-54, 2000. Las calicamicinas se aislaron por primera vez de *Micromonospora echinospora* y son miembros de la familia de antibióticos antitumorales de enediína que provocan roturas de la doble cadena en el ADN que conducen a la apoptosis (véase, por ejemplo, Lee et al., *J. Antibiot.* 42: 1070-87, 1989). El fármaco es el resto tóxico de una inmunotoxina en ensayos clínicos (véase, por ejemplo, Gillespie et al., *Ann. Oncol.* 11: 735-41, 2000).

- 45 La abrina incluye lectinas tóxicas de *Abrus precatorius*. Los principios tóxicos, abrina a, b, c y d, tienen un peso molecular de aproximadamente 63 y 67 kD y están compuestos de dos cadenas polipeptídicas A y B unidas por disulfuro. La cadena A inhibe la síntesis de proteínas; la cadena B (abrina-b) se une a restos de D-galactosa (véase, Funatsu et al., *Agr. Biol. Chem.* 52: 1095, 1988; y Olsnes, *Methods Enzymol.* 50: 330-335, 1978).

- En una realización, la toxina es la exotoxina de *Pseudomonas* (PE) (Patente de los EE.UU. N.º 5.602.095). Como se usa en el presente documento, PE incluye PE nativa de longitud completa (de origen natural) o una PE que se ha modificado. Dichas modificaciones pueden incluir, pero sin limitación, eliminación del dominio Ia, diversas supresiones de aminoácidos en los dominios Ib, II y III, sustituciones de aminoácidos individuales y la adición de una o más secuencias en el extremo carboxilo terminal (por ejemplo, véase Siegall et al., *J. Biol. Chem.* 264: 14256-14261, 1989). La PE empleada con los anticuerpos proporcionados puede incluir la secuencia nativa, fragmentos citotóxicos de la secuencia nativa y variantes modificadas conservadoramente de la PE nativa y sus fragmentos citotóxicos. Los fragmentos citotóxicos de la PE incluyen aquellos que son citotóxicos con o sin procesamiento proteolítico posterior u otro procesamiento posterior en la célula diana. Los fragmentos citotóxicos de la PE incluyen PE40, PE38 y PE35. Para una descripción adicional de la PE y variantes de la misma, véanse por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N.º 4.892.827; 5.512.658; 5.602.095; 5.608.039; 5.821.238; y 5.854.044; la Publicación PCT N.º WO 99/51643; Pai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3358-3362, 1991; Kondo et al., *J. Biol. Chem.*, 263: 9470-9475, 1988; Pastan et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1333: C1-C6, 1997.

- 60 También se contemplan en el presente documento variantes de la PE resistentes a proteasas y variantes de la PE con inmunogenia reducida, tales como, pero sin limitación, PE-LR, PE-6X, PE-8X, PE-LR/6X y PE-LR/8X (véase, por ejemplo, Weldon et al., *Blood* 113 (16): 3792-3800, 2009; Onda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105 (32): 11311-11316, 2008; y las Publicaciones PCT N.º WO 2007/016150, WO 2009/032954 y WO 2011/032022.

- 65 En algunos ejemplos, la PE es una variante que es resistente a la degradación lisosómica, tal como PE-LR (Weldon

et al., *Blood* 113 (16): 3792-3800, 2009; la Publicación PCT N.º WO 2009/032954). En otros ejemplos, la PE es una variante denominada PE-LR/6X (Publicación PCT N.º WO 2011/032022). En otros ejemplos, la PE es una variante denominada PELR/8M (Publicación PCT N.º WO 2011/032022).

5 Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a TEM8 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) también puede conjugarse con un marcador detectable; por ejemplo, un marcador detectable susceptible de
 10 detección mediante ELISA, espectrofotometría, citometría de flujo, microscopía o técnicas de diagnóstico por imagen (tales como tomografía computarizada (TC), exploraciones por tomografía axial computarizada (TAC), formación de imágenes mediante resonancia magnética (RM), formación de imágenes mediante resonancia magnética nuclear
 15 RMN), tomografía por resonancia magnética (TRM), ecografía, examen por fibra óptica y examen laparoscópico). Los ejemplos específicos, no limitantes, de marcadores detectables incluyen fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enlaces enzimáticos, isótopos radiactivos y metales o compuestos pesados (por ejemplo, nanocristales de óxido de hierro súper paramagnéticos para la detección mediante RM). Por ejemplo, los
 20 marcadores detectables útiles incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina, fósforos de lantánidos y similares. También se usan marcadores bioluminiscentes, tales como luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente amarilla (YFP). Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno también puede conjugarse con enzimas que sean útiles para la detección, tales como peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa
 25 alcalina, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se conjuga con una enzima detectable, puede detectarse añadiendo reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción que puede discernirse. Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable visualmente. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno también puede conjugarse con biotina y detectarse a través de medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Cabe señalar que la propia avidina
 30 puede conjugarse con una enzima o un marcador fluorescente.

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede conjugarse con un agente paramagnético, tal como el gadolinio. También se usan agentes paramagnéticos tales como el óxido de hierro superparamagnético como
 35 marcadores. Los anticuerpos también pueden conjugarse con lantánidos (tales como el europio y el disprosio) y el manganeso. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno también puede marcarse con un epítipo de polipéptido predeterminado reconocido por un indicador secundario (tal como secuencias de pares de cremalleras de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcadores de epítipo).

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno también puede conjugarse con un aminoácido radiomarcado. El
 35 radiomarcador puede usarse con fines tanto diagnósticos como terapéuticos. Por ejemplo, el radiomarcador puede usarse para detectar TEM8 y células que expresan TEM8 mediante rayos X, espectros de emisión u otras técnicas de diagnóstico. Adicionalmente, el radiomarcador puede usarse terapéuticamente como una toxina para el tratamiento de tumores en un sujeto, por ejemplo, para el tratamiento de carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma colorrectal o melanoma. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los
 40 siguientes radioisótopos o radionucleótidos: ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{111}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I .

Los medios de detección de dichos marcadores detectables son bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Por tanto, por ejemplo, pueden detectarse radiomarcadores usando película fotográfica o contadores de
 45 centelleo, pudiéndose detectar los marcadores fluorescentes usando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos se detectan normalmente proporcionando a la enzima un sustrato y detectando producto de reacción producido mediante la acción de la enzima sobre el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan visualizando simplemente el marcador coloreado.

Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno también puede derivatizarse con un grupo químico tal como
 50 polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo o un grupo hidrato de carbono. Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, tal como para aumentar la semivida sérica o para aumentar la unión al tejido.

El número promedio de moléculas efectoras o restos marcadores detectables por anticuerpo o fragmento de unión a
 55 antígeno en un conjugado puede variar, por ejemplo, de 1 a 20 restos por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Para algunos conjugados, el número promedio de moléculas efectoras o restos marcadores detectables por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Por ejemplo, cuando la unión se realiza en un tiol de cisteína, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede tener solo uno o varios grupos tiol de cisteína o puede tener solo
 60 uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos a través de los cuales puede unirse un enlazador. En determinadas realizaciones, el número promedio de moléculas efectoras o restos marcadores detectables por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en un conjugado varía de 1 a aproximadamente 8; de aproximadamente 2 a aproximadamente 6; de aproximadamente 3 a aproximadamente 5; de aproximadamente 3 a aproximadamente 4; de aproximadamente 3,1 a aproximadamente 3,9; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,8; de
 65 aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,7; de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 3,6; de aproximadamente 3,3 a aproximadamente 3,8; o de aproximadamente 3,3 a aproximadamente 3,7. Véase, por

ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 7.498.298. El número promedio de moléculas efectoras o restos marcadores detectables por anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en preparaciones de conjugados puede caracterizarse mediante medios convencionales tales como espectroscopía de masas y ensayo ELISA. La carga (por ejemplo, la relación molécula efectora/anticuerpo) de un conjugado puede controlarse de diferentes maneras, por ejemplo: (i) limitando el exceso molar de molécula efectora-intermedio enlazador o reactivo enlazador con respecto a anticuerpo, (ii) limitando el tiempo o la temperatura de reacción de conjugación, (iii) condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación de tiol de cisteína, (iv) modificando mediante técnicas recombinantes la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de manera que el número y la posición de los restos de cisteína se modifiquen para controlar el número o posición de las uniones del enlazador-molécula efectora (tal como thioMab o thioFab preparados como se desvela en el documento WO 2006/03448).

C. Receptores de antígeno quimérico (CAR)

También se desvelan en el presente documento receptores de antígeno quimérico (CAR) que son proteínas quiméricas construidas artificialmente que incluyen un dominio de unión a antígeno extracelular (por ejemplo, fragmento variable monocatenario (scFv)) que se une específicamente a TEM8, unido a un dominio transmembrana, unido a uno o más dominios de señalización de linfocitos T intracelulares. Las características de los CAR desvelados incluyen su capacidad para redirigir la especificidad de los linfocitos T y la reactividad hacia las células que expresan TEM8 de una manera no restringida por el CMH. El reconocimiento de TEM8 no restringido por CMH proporciona a los linfocitos T que expresan un CAR desvelado la capacidad de reconocer el antígeno independientemente del procesamiento del antígeno.

Los dominios de señalización de linfocitos T intracelulares pueden incluir, por ejemplo, un dominio de señalización del receptor de linfocitos T, un dominio de señalización coestimuladora de linfocitos T o ambos. El dominio de señalización del receptor de linfocitos T se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de un receptor de linfocitos T, tal como la porción intracelular de la proteína zeta CD3. El dominio de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora, que es una molécula de la superficie celular distinta de un receptor antigénico o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficiente de los linfocitos al antígeno.

1. Región extracelular

Varias realizaciones proporcionan un CAR que incluye un dominio de unión a antígeno que se une específicamente a TEM8 como se desvela en el presente documento. Por ejemplo, el dominio de unión a antígeno puede ser un scFv que incluye la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera de cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos desvelados anteriormente.

En alguna realización, el dominio de unión a antígeno puede incluir una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera incluyendo HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y LCDR1, LCDR2 y LCDR3 de las regiones variables de la cadena pesada y ligera, respectivamente, de uno de los anticuerpos m825, m822, M830 o m863 (por ejemplo, como se establece en la Tabla 1 o la Tabla 2).

En algunas realizaciones, el dominio de unión a antígeno incluye una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera que incluyen las secuencias de aminoácidos establecidas como las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente; las SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente; las SEQ ID NO: 5 y 6, respectivamente; o las SEQ ID NO: 7 y 8, respectivamente.

En varias realizaciones, el dominio de unión a antígeno puede ser un scFv. En algunas realizaciones, el scFv incluye una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera unidas por un enlazador peptídico, tal como un enlazador que incluye la secuencia de aminoácidos establecida como GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 19).

El CAR puede incluir una secuencia de péptido señal, por ejemplo, N-terminal con respecto al dominio de unión a antígeno. La secuencia de péptido señal puede comprender cualquier secuencia de péptido señal adecuada. En una realización, la secuencia de péptido señal es una secuencia del receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos humano (GM-CSF), tal como una secuencia de aminoácidos que incluye o que consiste en LLVTSLLLCELPHPAFLIPDT SEQ ID NO: 20. Aunque la secuencia de péptido señal puede facilitar la expresión del CAR en la superficie de la célula, la presencia de la secuencia de péptido señal en un CAR expresado no es necesaria con el fin de que el CAR funcione. Tras la expresión del CAR en la superficie celular, la secuencia de péptido señal puede separarse del CAR. En consecuencia, en algunas realizaciones, el CAR carece de una secuencia de péptido señal.

Entre el dominio de unión a antígeno y el dominio transmembrana del CAR, puede haber un dominio espaciador, que incluye una secuencia polipeptídica. El dominio espaciador puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos y mucho más preferentemente de 25 a 50 aminoácidos. En algunas realizaciones, el dominio espaciador puede incluir un dominio de inmunoglobulina, tal como una secuencia de

inmunoglobulina humana. En una realización, el dominio de inmunoglobulina comprende una secuencia de dominio de inmunoglobulina G (IgG) CH2 y CH3 de inmunoglobulina (CH2CH3). En este sentido, el dominio espaciador puede incluir un dominio de inmunoglobulina que comprende o que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 21:

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPK

Sin pretender quedar ligado a una teoría particular, se cree que el dominio CH2CH3 prolonga el dominio de unión a antígeno del CAR lejos de la membrana de las células que expresan CAR y puede imitar con mayor precisión el tamaño y la estructura del dominio de un TCR nativo.

2. Dominio transmembrana

Con respecto al dominio transmembrana, el CAR puede diseñarse para comprender un dominio transmembrana que se fusione con el dominio extracelular del CAR. En una realización, se usa el dominio transmembrana que se asocia de forma natural a uno de los dominios en el CAR.

El dominio transmembrana puede derivar de una fuente natural o sintética. Cuando la fuente es natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína unida a la membrana o transmembrana. Los dominios transmembrana de ejemplo para su uso en los CAR desvelados pueden incluir al menos la región o regiones transmembrana de la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD154. Como alternativa, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso comprenderá predominantemente restos hidrófobos tales como leucina y valina. En varias realizaciones, se encontrará un triplete de fenilalanina, triptófano y valina en cada extremo de un dominio transmembrana sintético.

Opcionalmente, un enlazador oligo o polipeptídico corto, preferentemente de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud, puede formar el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización de linfocitos T intracelular y/o el dominio coestimulador de linfocitos T del CAR. Una secuencia enlazadora de ejemplo incluye uno o más dobletes de glicina-serina.

En algunas realizaciones, el dominio transmembrana comprende el dominio transmembrana de un receptor de linfocitos T, tal como un dominio transmembrana CD8. Por tanto, el CAR puede incluir un dominio transmembrana CD8 que incluye o consiste en la SEQ ID NO: 22: TTTAPRPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC En otra realización, el dominio transmembrana comprende el dominio transmembrana de una molécula coestimuladora de linfocitos T, tal como CD137 o CD28. Por tanto, el CAR puede incluir un dominio transmembrana CD28 que incluye o consiste en la SEQ ID NO: 23: IEVMPYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFVWLWVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVR.

3. Región intracelular

La región intracelular del CAR incluye uno o más dominios de señalización de linfocitos T intracelulares responsables de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de un linfocito T en el que se expresa o coloca el CAR. Se proporcionan en el presente documento y se conocen por el experto habitual en la materia dominios de señalización de linfocitos T de ejemplo.

Aunque puede emplearse un dominio de señalización de linfocitos T intracelulares completo en un CAR, en muchos casos no es necesario usar toda la cadena. En la medida en que se use una porción truncada del dominio de señalización de linfocitos T intracelulares, dicha porción truncada puede usarse en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de función efectora de linfocitos T relevante.

Los ejemplos de dominios de señalización de linfocitos T intracelulares para su uso en el CAR incluyen las secuencias citoplasmáticas del receptor de linfocitos T (TCR) y las moléculas coestimuladoras que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales después de la activación del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

Los dominios de señalización del receptor de linfocitos T regulan la activación primaria del complejo del receptor de

linfocitos T, ya sea de manera estimulante o inhibidora. Los CAR desvelados pueden incluir secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúen de forma estimulante, que pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación inmunorreceptores a base de tirosina o ITAM. Los ejemplos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que pueden incluirse en un CAR desvelado incluyen los de las proteínas CD3 zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CDS, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. En varias realizaciones, la molécula de señalización citoplasmática en el CAR incluye un dominio de señalización de linfocitos T intracelulares de CD3 zeta.

La región intracelular del CAR puede incluir el dominio de señalización citoplasmática primario que contiene ITAM (tal como CD3-zeta) solo o combinado con cualquier otro dominio o dominios citoplasmáticos deseados útiles en el contexto de un CAR. Por ejemplo, el dominio citoplasmático del CAR puede incluir una porción de cadena de CD3 zeta y un dominio de señalización intracelular coestimuladora. El dominio de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que es necesaria para una respuesta eficiente de los linfocitos a un antígeno. Los ejemplos de dichas moléculas incluyen CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40 (CD134), CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C y B7-H3. Un ejemplo adicional de un dominio de señalización que puede incluirse en un CAR desvelado es un dominio de señalización del miembro 18 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF18; también conocido como proteína relacionada con TNFR inducida por glucocorticoides, GITR).

En algunas realizaciones, el CAR puede incluir un dominio de señalización de CD3 zeta, un dominio de señalización de CD8, un dominio de señalización de CD28, un dominio de señalización de CD137 o una combinación de dos o más de los mismos. En una realización, el dominio citoplasmático incluye el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En otra realización, el dominio citoplasmático incluye el dominio de señalización de CD3 zeta y el dominio de señalización de CD137. En otra realización más, el dominio citoplasmático incluye el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28 y CD137. El orden del uno o más dominios de señalización de linfocitos T en el CAR puede variar según necesite el experto habitual en la materia.

Se proporcionan secuencias de aminoácidos de ejemplo para dichos dominios de señalización de linfocitos T. Por ejemplo, el dominio de señalización de CD3 zeta puede incluir o consistir en la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 24 (RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNEL OKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYCGLSTATKDTYDALHMOALPPR), el dominio de señalización de CD8 puede incluir o consistir en la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 25 (FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTC GVLVLLSLVITLYCNHRNR), el dominio de señalización de CD28 puede incluir o consistir en la secuencia de aminoácidos expuesta como la SEQ ID NO: 26 (SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS), el dominio de señalización de CD137 puede incluir o consistir en las secuencias de aminoácidos expuestas como la SEQ ID NO: 27 (KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL) o la SEQ ID NO: 28 (RFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL).

Las secuencias de señalización citoplasmática dentro de la porción de señalización citoplasmática del CAR de la invención pueden estar unidas entre sí en un orden aleatorio o especificado. Opcionalmente, un enlazador polipeptídico corto, preferentemente de entre 2 y 10 aminoácidos de longitud puede formar la unión. Un doblete glicina-serina proporciona un enlazador en particular adecuado. Adicionalmente, entre el dominio de señalización y el dominio transmembrana del CAR, puede haber un dominio espaciador, que incluye una secuencia polipeptídica. El dominio espaciador puede comprender hasta 300 aminoácidos, preferentemente de 10 a 100 aminoácidos y mucho más preferentemente de 25 a 50 aminoácidos.

4. Descripción adicional de los CAR

También se proporcionan porciones funcionales de los CAR que se describen en el presente documento. La expresión "porción funcional" cuando se usa en referencia a un CAR se refiere a cualquier parte o fragmento del CAR, parte o fragmento que conserva la actividad biológica del CAR del que es parte (el CAR parental). Las porciones funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas partes de un CAR que conservan la capacidad de reconocer células diana o detectar, tratar o prevenir una enfermedad, en una medida similar, la misma medida o en mayor medida, que el CAR parental. Con referencia al CAR parental, la porción funcional puede comprender, por ejemplo, aproximadamente el 10 %, el 25 %, el 30 %, el 50 %, el 68 %, el 80 %, el 90 %, el 95 % o más, del CAR parental.

El CAR o la porción funcional del mismo, puede incluir aminoácidos adicionales en el extremo amino o carboxi, o en ambos extremos, cuyos aminoácidos adicionales no se encuentran en la secuencia de aminoácidos del CAR parental. De manera deseable, los aminoácidos adicionales no interfieren con la función biológica del CAR o la porción funcional, por ejemplo, reconocer células diana, detectar el cáncer, tratar o prevenir el cáncer, etc. Más deseablemente, los aminoácidos adicionales potencian la actividad biológica, en comparación con la actividad biológica del CAR parental.

También se proporcionan variantes funcionales de los CAR que se describen en el presente documento, que tienen una identidad de secuencia sustancial o significativa o similitud con un CAR parental, cuya variante funcional conserva la actividad biológica del CAR del que es una variante. Las variantes funcionales abarcan, por ejemplo, aquellas variantes del CAR que se describe en el presente documento (el CAR parental) que conservan la capacidad de reconocer células diana en una medida similar, la misma medida o en mayor medida, que el CAR parental. Con referencia al CAR parental, la variante funcional puede ser idéntica, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 91 %, aproximadamente el 92 %, aproximadamente el 93 %, aproximadamente el 94 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 98 %, aproximadamente el 99 % o más en la secuencia de aminoácidos al CAR parental.

La variante funcional puede, por ejemplo, comprender la secuencia de aminoácidos del CAR parental con al menos una sustitución conservadora de aminoácidos. Como alternativa o adicionalmente, las variantes funcionales pueden comprender la secuencia de aminoácidos del CAR parental con al menos una sustitución de aminoácidos no conservadora. En este caso, es preferible que la sustitución de aminoácidos no conservadora no interfiera o inhiba la actividad biológica de la variante funcional. La sustitución de aminoácidos no conservadora puede potenciar la actividad biológica de la variante funcional, de manera que la actividad biológica de la variante funcional aumenta en comparación con el CAR parental.

Los CAR (incluyendo las porciones funcionales y las variantes funcionales) pueden tener cualquier longitud, es decir, pueden comprender cualquier número de aminoácidos, a condición de que los CAR (o porciones funcionales o variantes funcionales de los mismos) conserven su actividad biológica, por ejemplo, la capacidad de unirse específicamente al antígeno, detectan células enfermas en un mamífero o tratan o previenen enfermedades en un mamífero, etc. Por ejemplo, el CAR puede tener una longitud de aproximadamente 50 a aproximadamente 5000 aminoácidos, tal como de 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o más aminoácidos de longitud.

Los CAR (incluyendo las porciones funcionales y las variantes funcionales de la invención) pueden comprender aminoácidos sintéticos en lugar de uno o más aminoácidos naturales. Dichos aminoácidos sintéticos se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido aminociclohexano carboxílico, norleucina, ácido α -amino n -decanoico, homoserina, S -acetilaminometil-cisteína, trans-3- y trans-4-hidroxiprolina, 4-aminofenilalanina, 4-nitrofenilalanina, 4-clorofenilalanina, 4-carboxifenilalanina, β -fenilserina β -hidroxifenilalanina, fenilglicina, α -naftilalanina, ciclohexilalanina, ciclohexilglicina, ácido indolina-2-carboxílico, ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico, ácido aminomalónico, monoamida del ácido aminomalónico, N' -bencil- N' -metil-lisina, N' , N' -dibencil-lisina, 6-hidroxisilisina, ornitina, ácido α -aminociclopentano carboxílico, ácido α -aminociclohexano carboxílico, ácido ocaminocicloheptano carboxílico, ácido (2-amino-2-norbornano)-carboxílico, ácido γ -diaminobutírico, ácido α,β -diaminopropiónico, homofenilalanina y α -*terc*-butilglicina.

Los CAR (incluyendo las porciones funcionales y las variantes funcionales) pueden estar glucosilados, amidados, carboxilados, fosforilados, esterificados, N -acilados, ciclados a través de, por ejemplo, un puente disulfuro o pueden convertirse en una sal de adición de ácido, y/o pueden estar opcionalmente dimerizados o polimerizados, o conjugados.

Se conocen en la técnica procedimientos de generación de receptores de antígeno quiméricos, linfocitos T que incluyen dichos receptores y su uso (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer), y se describen adicionalmente en el presente documento (véase, por ejemplo, Brentjens et al., 2010, *Molecular Therapy*, 18: 4, 666-668; Morgan et al., 2010, *Molecular Therapy*, publicado en línea el 23 de febrero de 2010, páginas 1-9; Till et al., 2008, *Blood*, 112: 2261-2271; Park et al., *Trends Biotechnol.*, 29: 550-557, 2011; Grupp et al., *N Engl J Med.*, 368: 1509-1518, 2013; Han et al., *J. Hematol Oncol.*, 6: 47, 2013; Las publicaciones PCT WO2012/079000, WO2013/126726; y la Publicación de los EE.UU. 2012/0213783). Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un receptor de unión a antígeno quimérico desvelado puede incluirse en un vector de expresión (tal como un vector lentivírico) para la expresión en una célula hospedadora, tal como un linfocito T, para preparar el CAR desvelado. En algunas realizaciones, los procedimientos de uso del receptor de antígeno quimérico incluyen aislar linfocitos T de un sujeto, transformar los linfocitos T con un vector de expresión (tal como un vector lentivírico) que codifica el receptor de antígeno quimérico y administrar los linfocitos T modificados mediante ingeniería genética que expresan el antígeno quimérico receptor al sujeto para el tratamiento, por ejemplo, para el tratamiento de un tumor en el sujeto.

D. Polinucleótidos y expresión

Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican las secuencias de aminoácidos de anticuerpos, fragmentos de unión a anticuerpos, conjugados y CAR que se unen específicamente a TEM8. Los ácidos nucleicos que codifican estas moléculas pueden ser producidos fácilmente por un experto en la materia, usando las secuencias de aminoácidos que se proporcionan en el presente documento (tal como las secuencias CDR, las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera), las secuencias disponibles en la técnica (tales como las secuencias marco conservadas) y el código genético. Un experto en la materia puede usar fácilmente el código genético para construir una diversidad de ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como ácidos nucleicos que difieren en la secuencia pero que

codifican la misma secuencia de anticuerpos o codifican un conjugado o proteína de fusión que incluye la secuencia de ácido nucleico de V_L y/o V_H .

Las secuencias de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, fragmentos de unión a anticuerpos, conjugados y CAR que se unen específicamente a TEM8 pueden prepararse mediante cualquier procedimiento adecuado incluyendo, por ejemplo, clonación de secuencias apropiadas o mediante síntesis química directa mediante procedimientos tales como el procedimiento de fosfortriéster de Narang et al., *Meth. Enzymol.* 68: 90-99, 1979; El procedimiento del fosfodiéster de Brown et al., *Meth. Enzymol.* 68: 109-151, 1979; el procedimiento de dietilfosforamidita de Beaucage et al., *Tetra. Lett.* 22: 1859-1862, 1981; el procedimiento del triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, *Tetra. Letts.* 22 (20): 1859-1862, 1981, por ejemplo, usando un sintetizador automático como se describe en, por ejemplo, Needham-VanDevanter et al., *Nucl. Acids Res.* 12: 6159-6168, 1984; y, el procedimiento de soporte sólido de la Patente de los EE.UU. N.º 4.458.066. La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Este puede convertirse en ADN bicatenario mediante hibridación con una secuencia complementaria o mediante polimerización con una ADN polimerasa usando la cadena simple como molde. Un experto reconocería que aunque la síntesis química de ADN generalmente se limita a secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden obtenerse secuencias más largas mediante la ligadura de secuencias más cortas.

Pueden prepararse ácidos nucleicos de ejemplo mediante técnicas de clonación. Se conocen ejemplos de técnicas apropiadas de clonación y secuenciación, e instrucciones suficientes para dirigir a los expertos a través de muchos ejercicios de clonación (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4ª Ed, Cold Spring Harbor, Nueva York, 2012) y Ausubel et al. (En *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Nueva York, a través del suplemento 104, 2013). La información del producto de los fabricantes de reactivos biológicos y equipos experimentales también proporciona información útil. Dichos fabricantes incluyen la SIGMA Chemical Company (Saint Louis, MO), R&D Systems (Minneapolis, MN), Pharmacia Amersham (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCOBRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), FlukaChemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), Invitrogen (Carlsbad, CA) y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como muchas otras fuentes comerciales conocidas por un experto.

También pueden prepararse ácidos nucleicos mediante procedimientos de amplificación. Los procedimientos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS), el sistema de replicación de secuencias autosostenida (3SR). Los expertos en la materia conocen bien una amplia diversidad de procedimientos de clonación, células hospedadoras y procedimientos de amplificación *in vitro*.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico codifica un CAR según se proporciona en el presente documento para la expresión en un linfocito T para generar un linfocito T receptor de antígeno quimérico. La molécula de ácido nucleico que codifica el receptor de unión al antígeno quimérico puede incluirse en un vector (tal como un vector lentivírico) para su expresión en una célula hospedadora, tal como un linfocito T. Las células de ejemplo incluyen un linfocito T, un linfocito citolítico natural (NK), un linfocito T citotóxico (CTL) y un linfocito T regulador. Se conocen en la técnica procedimientos de generación de moléculas de ácido nucleico que codifican receptores de antígeno quiméricos y linfocitos T que incluyen dichos receptores (véase, por ejemplo, Brentjens et al., 2010, *Molecular Therapy*, 18: 4, 666-668; Morgan et al., 2010, *Molecular Therapy*, publicado en línea el 23 de febrero de 2010, páginas 1-9; Till et al., 2008, *Blood*, 112: 2261-2271; Park et al., *Trends Biotechnol.*, 29: 550-557, 2011; Grupp et al., *N Engl J Med.*, 368: 1509-1518, 2013; Han et al., *J. Hematol Oncol.*, 6: 47, 2013; Las publicaciones PCT WO2012/079000, WO2013/126726; y la Publicación de los EE.UU. 2012/0213783).

Las moléculas de ácido nucleico pueden expresarse en una célula modificada mediante ingeniería recombinante, tal como células de bacterias, plantas, levaduras, insectos y mamíferos. Los anticuerpos, los fragmentos de unión a antígeno y los conjugados pueden expresarse como cadenas V_H y/o V_L individuales (unidas a una molécula efectora o marcador detectable según sea necesario) o pueden expresarse como una proteína de fusión. Se conocen y se describen adicionalmente en el presente documento procedimientos de expresión y purificación de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Al-Rubeai (ed), *Antibody Expression and Production*, Springer Press, 2011). También puede expresarse una inmunoadhesina. Por tanto, en algunos ejemplos, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican un V_H y V_L y una inmunoadhesina. Las secuencias de ácido nucleico pueden codificar opcionalmente una secuencia líder.

Para crear un scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L pueden unirse operativamente a otro fragmento que codifique un enlazador flexible, por ejemplo, que codifique la secuencia de aminoácidos (Gly₄-Ser)₃, de manera que las secuencias V_H y V_L puedan expresarse en forma de una proteína monocatenaria contigua, con los dominios V_L y V_H unidos por el enlazador flexible (véase, por ejemplo, Bird et al., *Science* 242: 423-426, 1988; Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883, 1988; McCafferty et al., *Nature* 348: 552-554, 1990; Kontermann y Dubel (Ed), *Antibody Engineering*, Vol. 1-2, 2ª Ed., Springer Press, 2010; Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 2ª, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 2013). Opcionalmente, puede incluirse un sitio de escisión en un enlazador, tal como un sitio de escisión de furina.

El ácido nucleico que codifica un V_H y/o el V_L puede codificar opcionalmente un dominio Fc (inmunoadhesina). El dominio Fc puede ser un dominio Fc de IgA, IgM o IgG. El dominio Fc puede ser un dominio Fc optimizado, como se describe en la Solicitud de Patente Publicada de los EE.UU. N.º 2010/093979. En un ejemplo, la inmunoadhesina es un Fc de IgG₁.

El anticuerpo monocatenario puede ser monovalente, si solo se usa un solo V_H y V_L , bivalente, si se usan dos V_H y V_L , o polivalente, si se usan más de dos V_H y V_L . Pueden generarse anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se unen específicamente a TEM8 y a otro antígeno, tal como, pero sin limitación, CD3. El V_H y V_L codificados opcionalmente pueden incluir un sitio de escisión de furina entre los dominios V_H y V_L .

Los expertos en la materia conocen los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de proteínas incluyendo *E. coli*, otros hospedadores bacterianos, levaduras y diversas células eucariotas superiores tales como las estirpes celulares COS, CHO, HeLa y de mieloma.

Puede expresarse una o más secuencias de ADN que codifican los anticuerpos, fragmentos de unión a anticuerpos, conjugados y CAR *in vitro* mediante transferencia de ADN a una célula hospedadora adecuada. La célula puede ser procariota o eucariota. El término también incluye cualquier progenie de la célula hospedadora sujeto. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica a la célula parental puesto que puede haber mutaciones que se producen durante la replicación. Se conocen en la materia procedimientos de transferencia estable, lo que significa que el ADN extraño se mantiene continuamente en el hospedador. También se incluyen en la presente divulgación hibridomas que expresan los anticuerpos de interés.

Las secuencias polinucleotídicas que codifican el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o conjugado del mismo, pueden unirse operativamente a secuencias de control de la expresión. Una secuencia de control de la expresión unida operativamente a una secuencia codificante se liga de manera que la expresión de la secuencia codificante se consiga en condiciones compatibles con las secuencias de control de la expresión. Las secuencias de control de la expresión incluyen, pero sin limitación, promotores apropiados, potenciadores, terminadores de la transcripción, un codón de inicio (es decir, ATG) frente a un gen que codifica proteínas, señal de corte y empalme para intrones, mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción adecuada de ARNm y codones de parada apropiados.

Para obtener una expresión de alto nivel de un gen clonado, es deseable construir casetes de expresión que contengan, como mínimo, un promotor fuerte para dirigir la transcripción, un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción (secuencias internas de unión al ribosoma) y un terminador de la transcripción/traducción. Para *E. coli*, esto incluye un promotor tal como los promotores T7, trp, lac o lambda, un sitio de unión a ribosomas y, preferentemente, una señal de terminación de la transcripción. Para las células eucariotas, las secuencias de control pueden incluir un promotor y/o un potenciador derivado de, por ejemplo, un gen de inmunoglobulina, FITLV, SV40 o citomegalovirus, y una secuencia de poliadenilación, y pueden incluir adicionalmente secuencias donantes y/o aceptoras de corte y empalme (por ejemplo, secuencias aceptoras y donantes de corte y empalme de CMV y/o HTLV). Los casetes pueden transferirse a la célula hospedadora elegida mediante procedimientos bien conocidos tales como transformación o electroporación para *E. coli* y tratamiento con fosfato de calcio, electroporación o lipofección para células de mamífero. Las células transformadas por los casetes pueden seleccionarse por la resistencia a antibióticos conferida por genes contenidos en los casetes, tales como los genes amp, gpt, neo e hyg.

Las secuencias polinucleotídicas que codifican el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o conjugado del mismo pueden insertarse en un vector de expresión incluyendo, pero sin limitación, un plásmido, virus u otro vehículo que pueda manipularse para permitir la inserción o incorporación de secuencias y pueda expresarse en procariotas o eucariotas. Los hospedadores pueden incluir organismos microbianos, levaduras, insectos y mamíferos. Se conocen bien en la técnica procedimientos de expresión de secuencias de ADN que tienen secuencias eucariotas o víricas en procariotas. Se conocen en la técnica vectores de ADN víricos y plasmídicos biológicamente funcionales susceptibles de expresión y replicación en un hospedador.

Cuando el hospedador es un eucariota, pueden usarse dichos procedimientos de transfección de ADN como coprecipitados de fosfato de calcio, procedimientos mecánicos convencionales tales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encerrado en liposomas o vectores víricos. Las células eucariotas también pueden cotransformarse con secuencias polinucleotídicas que codifican el anticuerpo, el anticuerpo marcado o el fragmento de unión a Env de VIH-1 del mismo y una segunda molécula de ADN extraño que codifica un fenotipo seleccionable, tal como el gen de la timidina cinasa del herpes simple. Otro procedimiento es usar un vector vírico eucariota, tal como el virus de simio 40 (SV40) o el virus del papiloma bovino, para infectar o transformar transitoriamente las células eucariotas y expresar la proteína (véase, por ejemplo, *Viral Expression Vectors*, Springer press, Muzyczka ed., 2011). Un experto en la materia puede usar fácilmente sistemas de expresión tales como plásmidos y vectores de uso en la producción de proteínas en células incluyendo células eucariotas superiores tales como las células COS, CHO, HeLa y de mieloma.

Con fines de producir un CAR recombinante, la célula hospedadora puede ser una célula de mamífero. La célula hospedadora puede ser una célula humana. En algunas realizaciones, la célula hospedadora puede ser un linfocito

de sangre periférica (LSP) o una célula mononuclear de sangre periférica (CMSP) o un linfocito T. El linfocito T puede ser cualquier linfocito T, tal como un linfocito T cultivado, por ejemplo, un linfocito T primario o un linfocito T de una estirpe de linfocitos T cultivados, por ejemplo, Jurkat, SupT1, etc. o un linfocito T obtenido de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, el linfocito T puede obtenerse de numerosas fuentes, incluyendo, pero sin limitación, sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, el timo u otros tejidos o fluidos. Los linfocitos T también pueden enriquecerse o purificarse. El linfocito T puede ser un linfocito T humano. El linfocito T puede ser un linfocito T aislado de un ser humano. El linfocito T puede ser cualquier tipo de linfocito T y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, incluyendo, pero sin limitación, linfocitos T doble positivos CD4⁺/CD8⁺, linfocitos T auxiliares CD4⁺, por ejemplo, células Th₁ y Th₂, linfocitos T CD8⁺ (por ejemplo, linfocitos T citotóxicos), células infiltrantes de tumores, linfocitos T de memoria, linfocitos T indiferenciados y similares. El linfocito T puede ser un linfocito T CD8⁺ o un linfocito T CD4⁺.

También se proporciona una población de células que comprende al menos una célula hospedadora que se describe en el presente documento. La población de células puede ser una población heterogénea que comprende la célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos, además de al menos otra célula, por ejemplo, una célula hospedadora (por ejemplo, un linfocito T), que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinantes o una célula distinta de un linfocito T, por ejemplo, una célula B, un macrófago, un neutrófilo, un eritrocito, un hepatocito, una célula endotelial, una célula epitelial, una célula muscular, una célula cerebral, etc. Como alternativa, la población de células puede ser una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente células hospedadoras (por ejemplo, que consisten esencialmente en) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población también puede ser una población clonal de células, en la que todas las células de la población son clones de una única célula hospedadora que comprende un vector de expresión recombinante, de manera que todas las células de la población comprenden el vector de expresión recombinante. En una realización de la invención, la población de células es una población clonal que comprende células hospedadoras que comprenden un vector de expresión recombinante como se describe en el presente documento.

Pueden hacerse modificaciones a un ácido nucleico que codifica un polipéptido que se describe en el presente documento sin disminuir su actividad biológica. Pueden hacerse algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión o incorporación de la molécula de direccionamiento a una proteína de fusión. Dichas modificaciones son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, codones de terminación, una metionina añadida en el extremo amino para proporcionar un sitio de inicio, aminoácidos adicionales colocados en cualquier extremo para crear sitios de restricción convenientemente ubicados o aminoácidos adicionales (tales como poli His) para ayudar en las etapas de purificación. Además de los procedimientos recombinantes, los inmunoconjugados, los restos efectoros y los anticuerpos de la presente divulgación también pueden construirse total o parcialmente usando la síntesis peptídica convencional bien conocida en la técnica.

Una vez expresados, los anticuerpos, los fragmentos de unión a antígeno y los conjugados pueden purificarse de acuerdo con los procedimientos convencionales en la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna y similares (véase, en general, Simpson ed., *Basic methods in Protein Purification and Analysis: A laboratory Manual*, Cold Harbor Press, 2008). No es necesario que los anticuerpos, el fragmento de unión a antígeno y los conjugados sean puros al 100 %. Una vez purificados, parcialmente o a la homogeneidad que se desee, si han de usarse terapéuticamente, los polipéptidos deberían estar sustancialmente libres de endotoxina.

Se han descrito y se conocen bien procedimientos para la expresión de anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y conjugados, y/o el plegamiento a una forma activa apropiada, a partir de células de mamífero y bacterias tales como *E. coli*, y son aplicables a los anticuerpos que se desvelan en el presente documento. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 2^a, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 2013, Simpson ed., *Basic methods in Protein Purification and Analysis: A laboratory Manual*, Cold Harbor Press, 2008 y Ward et al., *Nature* 341: 544, 1989.

Con frecuencia, se aíslan proteínas heterólogas funcionales de *E. coli* u otras bacterias de los cuerpos de inclusión y requieren solubilización usando desnaturizantes fuertes y plegamiento posterior. Durante la etapa de solubilización, como es bien sabido en la técnica, debe haber presente un agente reductor para separar los enlaces disulfuro. Un tampón de ejemplo con un agente reductor es: Tris 0,1 M pH 8, guanidina 6 M, EDTA 2 mM, DTE 0,3 M (ditioeritrol). La reoxidación de los enlaces disulfuro puede producirse en presencia de tior de bajo peso molecular en forma reducida y oxidada, como se describe en Saxena et al., *Biochemistry* 9: 5015-5021, 1970 y especialmente como se describe por Buchner et al, citado anteriormente.

Además de los procedimientos recombinantes, los anticuerpos, los fragmentos de unión a antígeno y/o los conjugados también pueden construirse en su totalidad o en parte usando síntesis peptídica convencional. La síntesis en fase sólida de los polipéptidos puede lograrse uniéndolo el aminoácido C-terminal de la secuencia a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia. Barany & Merrifield describen técnicas para la síntesis en fase sólida, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis*, Parte A. págs. 3-284; Merrifield et al., *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2156, 1963 y

Stewart et al., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª ed., Pierce Chem. Co., Rockford, Ill., 1984. Las proteínas de mayor longitud pueden sintetizarse mediante condensación de los extremos amino y carboxilo de fragmentos más cortos. Se conocen bien en la técnica procedimientos para formar enlaces peptídicos mediante la activación de un extremo carboxilo terminal (tal como mediante el uso del reactivo de acoplamiento N, N'-diciclohexilcarbodiimida).

5 **E. Procedimientos de detección**

Se proporcionan procedimientos para detectar la presencia de una célula que expresa TEM8 en un sujeto. En algunas realizaciones, los procedimientos incluyen poner en contacto una célula de un sujeto con uno o más de los anticuerpos que se unen específicamente a TEM8 o conjugados de los mismos para formar un complejo inmunitario. Después se detecta la presencia (o ausencia) del complejo inmunitario. La presencia del complejo inmunitario indica la presencia de una célula que expresa TEM8 en el sujeto. Los procedimientos de detección pueden implicar la detección *in vivo* o la detección *in vitro* del complejo inmunitario. En varias realizaciones, la detección de una célula que expresa TEM8 incluye detectar la expresión de TEM8 en la superficie celular en la célula endotelial. En varias realizaciones de los procedimientos proporcionados, la detección de una célula que expresa TEM8 en un sujeto detecta angiogénesis patológica en el sujeto, por ejemplo, la angiogénesis asociada al desarrollo tumoral. La célula puede ser una célula endotelial o un pericito, por ejemplo.

Por tanto, se proporcionan procedimientos para detectar una célula que expresa TEM8, por ejemplo, una célula endotelial que expresa TEM8 o un pericito que expresa TEM8. En un ejemplo específico no limitante, la célula es una célula endotelial. En algunas realizaciones, se selecciona un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar, un tumor, por ejemplo, un carcinoma. Por ejemplo, el sujeto tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma colorrectal o melanoma. En algunos ejemplos, el sujeto tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar, cáncer de mama, colorrectal, de pulmón o de piel. Por tanto, la presencia de una célula endotelial que expresa TEM8 puede detectarse en estos sujetos. En algunos ejemplos, la detección de una célula endotelial que expresa TEM8 detecta un vaso sanguíneo que comprende al menos una célula endotelial que expresa TEM8. En algunos ejemplos, la célula endotelial es una célula endotelial vascular, por ejemplo, una célula endotelial vascular en un vaso sanguíneo asociado a un tumor.

En una realización, se obtiene una muestra de un sujeto y se evalúa la presencia de una célula endotelial que expresa TEM8 *in vitro*. Por ejemplo, dichos procedimientos incluyen poner en contacto una célula endotelial en una muestra biológica del sujeto con uno o más de los conjugados o anticuerpos que se proporcionan en el presente documento que se unen específicamente a TEM8 o un fragmento de unión a antígeno de los mismos para formar un complejo inmunitario. Después se detecta la presencia (o ausencia) del complejo inmunitario. La presencia del complejo inmunitario en la célula endotelial del sujeto indica la presencia de una célula endotelial que expresa TEM8 en el sujeto. Por ejemplo, un aumento en la presencia del complejo inmunitario en la muestra en comparación con la formación del complejo inmunitario en una muestra de control indica la presencia de una célula endotelial que expresa TEM8 en el sujeto.

Una muestra biológica se obtiene normalmente de un sujeto mamífero de interés, tal como un ser humano. La muestra puede ser cualquier muestra, incluyendo, pero sin limitación, tejido de biopsias, autopsias y muestras de anatomía patológica. Las muestras biológicas también incluyen secciones de tejidos, por ejemplo, secciones congeladas tomadas con fines histológicos.

En algunos ejemplos de los procedimientos desvelados, el anticuerpo específico de TEM8 o fragmento de unión a antígeno se conjuga con un marcador detectable. En algunos ejemplos, los procedimientos incluyen adicionalmente poner en contacto un segundo anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo específico de TEM8, un fragmento de unión a antígeno del mismo o un conjugado que incluye estas moléculas, durante un período de tiempo suficiente para formar un complejo inmunitario y detectar este complejo inmunitario. Un aumento en la presencia de este complejo inmunitario en una muestra biológica de un sujeto seleccionado (como se ha descrito anteriormente) en comparación con la presencia del complejo inmunitario en una muestra de control u otro patrón detecta la presencia de una célula endotelial que expresa TEM8 en la muestra biológica. En algunos ejemplos, el segundo anticuerpo se conjuga con un marcador detectable.

Se describen marcadores detectables adecuados para el anticuerpo o anticuerpo secundario y son conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, agentes magnéticos y materiales radiactivos. Los ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa. Los ejemplos no limitantes de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina. Los ejemplos no limitantes de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina. Un material luminiscente de ejemplo no limitante es el luminol; un ejemplo no limitante de agente magnético es el gadolinio y los ejemplos no limitantes de marcadores radiactivos incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

Los anticuerpos que se unen específicamente a TEM8 y los conjugados de los mismos pueden usarse en ensayos

inmunohistoquímicos. Estos ensayos son bien conocidos por un experto en la materia (véase Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Publications, Nueva York (2013), para una descripción de formatos de inmunoensayo.

- 5 Los anticuerpos que se desvelan en el presente documento también pueden usarse para detectar células endoteliales que expresan TEM8 así como pericitos que expresan TEM8 *in vivo*. En algún ejemplo, la detección *in vivo* de una célula endotelial que expresa TEM8 detecta angiogénesis patológica en el sujeto. Por tanto, se desvelan procedimientos para detectar angiogénesis patológica en un sujeto, tal como la angiogénesis patológica asociada a un tumor, tal como un carcinoma; por ejemplo, un carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma colorrectal o melanoma.
- 10 En una realización, una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une específicamente a TEM8 (o fragmento de unión a antígeno del mismo) o un conjugado del mismo se administra al sujeto durante una cantidad de tiempo suficiente para que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno forme un complejo inmunitario, que después puede detectarse. La detección del complejo inmunitario en el sujeto determina la presencia de una célula endotelial que expresa TEM8, que detecta angiogénesis patológica en el sujeto. En un ejemplo específico, no limitante, la detección de un complejo inmunitario se realiza mediante inmunocentellografía. Otros ejemplos específicos, no limitantes, de detección de complejos inmunitarios incluyen radiolocalización, radioimagen, formación de imágenes por resonancia magnética (tal como el uso de un anticuerpo biotinilado y avidina-óxido de hierro), formación de imágenes por tomografía por emisión de positrones (tal como el uso de un anticuerpo monoclonal marcado con ¹¹¹ indio) o formación de imágenes por fluorescencia (tal como el uso de luciferasa o anticuerpos marcados con proteínas fluorescente verde). Véase Paty et al., *Transplantation*, 77: 1133-1137, 2004, incorporado en el presente documento como referencia. En varios ejemplos, el procedimiento desvelado detecta células endoteliales que revisten la pared interna de los vasos sanguíneos en un tumor en el sujeto, por ejemplo, un carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma colorrectal o melanoma.
- 25 En el contexto de la formación de imágenes por resonancia magnética, la detección del agente de contraste puede verse muy afectada por la intensidad del campo del escáner de resonancia magnética. El aumento de las intensidades de campo proporciona mejoras de órdenes de magnitud en la capacidad de detectar agentes de contraste (Hu et al., *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, 6: 157-184, 2004; Wedeking et al., *Magn. Reson. Imaging.*, 17: 569-575, 1999). Por ejemplo, el límite de detección de gadolinio a 2 tesla (T) es de -30 µM. A 4 T el límite de detección se reduce a ~1 µM. Con los nuevos escáneres disponibles de 7 a 12 T, se esperaría detectar concentraciones bajas (10-100) nM de este agente de contraste. También puede identificarse una sensibilidad similar usando agentes de contraste tales como el óxido de hierro. Una vez detectados, los resultados del ensayo pueden usarse para ayudar o guiar la extirpación quirúrgica o de otro tipo de un tumor.
- 30 En una realización, se administra una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a TEM8 o un conjugado del mismo a un sujeto que tiene un tumor después de un tratamiento antineoplásico o antiangiogénico. Después de que ha transcurrido una cantidad de tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno o el conjugado administrado forme un complejo inmunitario con TEM8 en una célula endotelial, se detecta el complejo inmunitario. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a TEM8 o conjugado del mismo puede administrarse a un sujeto antes o después del tratamiento de un tumor. El tumor puede ser (pero sin limitación) un cáncer de mama, colorrectal, de pulmón o de piel. La presencia (o ausencia) del complejo inmunitario indica la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, un aumento en el complejo inmunitario en comparación con un control tomado antes del tratamiento indica que el tratamiento no es eficaz, mientras que una disminución en el complejo inmunitario en comparación con un control tomado antes del tratamiento indica que el tratamiento es eficaz.
- 45

F. Procedimientos de tratamiento

- Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a TEM8 o conjugado del mismo o un linfocito T CAR que expresa un fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a TEM8 puede administrarse a un sujeto para tratar la angiogénesis patológica, por ejemplo, para tratar un tumor, por ejemplo, un carcinoma. En algunas realizaciones, la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a TEM8 o conjugado del mismo o célula CAR T que expresa un fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a TEM8 disminuye la angiogénesis patológica, tal como la angiogénesis patológica que se produce en diversos tipos de cáncer, tales como el cáncer de mama, colorrectal, de pulmón o de piel o con degeneración macular. Por tanto, para el tratamiento puede seleccionarse un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar un tumor, tal como un carcinoma.
- 50 En algunos ejemplos, los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, linfocitos T CAR, composiciones y conjugados que se desvelan en el presente documento pueden administrarse a un sujeto para disminuir la angiogénesis patológica en el sujeto, para ralentizar o inhibir el crecimiento o metástasis de un tumor o tratar la degeneración corneal o retiniana. En estas aplicaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a TEM8 o un conjugado o linfocitos T CAR o composición se administra a un sujeto en una cantidad y en condiciones suficientes para formar un complejo inmunitario con TEM8, disminuyendo o inhibiendo de este modo el crecimiento o la metástasis de un tumor u otra
- 60
- 65

angiogénesis patológica, o para inhibir un signo o un síntoma de un cáncer. Los ejemplos de sujetos adecuados incluyen aquellos diagnosticados o que se sospecha que tienen cáncer (por ejemplo, un sujeto que tiene un tumor), por ejemplo, sujetos que tienen un carcinoma, tal como un carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma colorrectal o melanoma.

La cantidad terapéuticamente eficaz dependerá de la gravedad de la enfermedad y del estado general de la salud del paciente. Una cantidad terapéuticamente eficaz es la que proporciona alivio subjetivo de un síntoma o síntomas o una mejora objetivamente identificable según lo observado por el médico u otro observador calificado. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es la cantidad necesaria para inhibir el crecimiento tumoral (tal como el crecimiento de un carcinoma de mama, carcinoma de pulmón, carcinoma colorrectal o melanoma), la angiogénesis patológica o la cantidad que es eficaz para reducir un signo o un síntoma del tumor. La cantidad terapéuticamente eficaz de los agentes administrados puede variar dependiendo de los efectos deseados y del sujeto que ha de tratarse. En algunos ejemplos, las cantidades terapéuticas son cantidades que eliminan o reducen la carga tumoral del paciente, o que previenen o reducen la proliferación de células metastásicas, o que previenen o reducen la angiogénesis patológica.

Los sujetos que pueden beneficiarse de los procedimientos desvelados incluyen sujetos humanos y veterinarios. Los sujetos pueden explorarse antes de iniciar las terapias desveladas, por ejemplo, para determinar si el sujeto tiene un tumor o angiogénesis patológica o ambos. La presencia de un tumor o angiogénesis patológica o ambos, indica que el tumor o la angiogénesis patológica pueden tratarse usando los procedimientos que se proporcionan en el presente documento.

Puede usarse cualquier procedimiento de administración para los anticuerpos desvelados, fragmentos de unión a antígeno, conjugados, composiciones y agentes adicionales, incluyendo la administración local y sistémica. Por ejemplo, puede usarse administración por vía tópica, oral, intravascular tal como intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intradérmica, intratecal y subcutánea. El modo particular de administración y la pauta de dosificación serán seleccionados por el médico especialista, teniendo en cuenta los detalles del caso (por ejemplo, el sujeto, la enfermedad, la patología implicada y si el tratamiento es profiláctico). En los casos en los que se administra más de un agente o composición, pueden usarse una o más vías de administración; por ejemplo, puede administrarse un agente quimioterápico por vía oral y puede administrarse un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o conjugado o composición por vía intravenosa. Los procedimientos de administración incluyen la inyección para la que los conjugados, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o composiciones se proporcionan en un vehículo farmacéuticamente aceptable no tóxico tal como agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, albúmina sérica humana al 5 %, aceites no volátiles, oleato de etilo o liposomas. En algunas realizaciones, puede usarse la administración local de los compuestos desvelados, por ejemplo, mediante aplicación del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno a una región de tejido de la que se ha extirpado un tumor, o una región que se sospecha que es propensa al desarrollo de tumores. En algunas realizaciones, la liberación sostenida intratumoral (o casi tumoral) de la preparación farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede ser beneficiosa. En otros ejemplos, el conjugado se aplica como un colirio por vía tópica a la córnea o por vía intravítrea en el ojo.

Las composiciones que incluyen un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o conjugado del mismo o linfocitos T CAR pueden formularse en una forma de dosificación unitaria adecuada para la administración individual de dosis precisas. Además, las composiciones pueden administrarse en una dosis única o en una pauta de dosis múltiples. Una pauta de dosis múltiples es una en la que un curso primario de tratamiento puede ser con más de una dosis separada, por ejemplo, 1-10 dosis, seguido de otras dosis administradas en intervalos de tiempo posteriores según sea necesario para mantener o reforzar la acción de las composiciones. El tratamiento puede implicar dosis diarias o diarias múltiples de compuesto o compuestos durante un período de unos pocos días a meses o incluso años. Por tanto, la pauta de dosificación también se determinará, al menos en parte, basándose en las necesidades particulares del sujeto que ha de tratarse y dependerán del criterio del profesional que la administre.

Las dosis típicas de los anticuerpos, conjugados, composiciones o agentes adicionales pueden variar de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg/kg, tal como de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg. En algunos ejemplos, la dosis es de al menos aproximadamente 0,1 mg/kg, al menos aproximadamente 0,2 mg/kg, al menos aproximadamente 0,3 mg/kg, al menos aproximadamente 0,4 mg/kg, al menos aproximadamente 0,5 mg/kg, al menos aproximadamente 1 mg/kg, al menos aproximadamente 4 mg/kg, al menos aproximadamente 3 mg/kg, al menos aproximadamente 5 mg/kg, al menos aproximadamente 6 mg/kg, al menos aproximadamente 7 mg/kg, al menos aproximadamente 8 mg/kg, al menos aproximadamente 9 mg/kg, al menos aproximadamente 10 mg/kg, al menos aproximadamente 11 mg/kg, al menos aproximadamente 12 mg/kg, al menos aproximadamente 13 mg/kg, al menos aproximadamente 14 mg/kg, al menos aproximadamente 15 mg/kg, al menos aproximadamente 16 mg/kg, al menos aproximadamente 17 mg/kg, al menos aproximadamente 18 mg/kg, al menos aproximadamente 19 mg/kg, al menos aproximadamente 20 mg/kg, al menos aproximadamente 21 mg/kg, al menos aproximadamente 22 mg/kg, al menos aproximadamente 23 mg/kg, al menos aproximadamente 24 mg/kg, al menos aproximadamente 25 mg/kg, al menos aproximadamente 26 mg/kg, al menos aproximadamente 27 mg/kg, al menos aproximadamente 28 mg/kg, al menos aproximadamente 29 mg/kg o al menos aproximadamente 30 mg/kg.

En ejemplos particulares, se administra al sujeto una composición terapéutica que incluye uno o más de los conjugados, anticuerpos, composiciones, linfocitos T CAR o agentes adicionales, en una pauta de dosificación diaria múltiple, tal como al menos dos días consecutivos, 10 días consecutivos, etc., por ejemplo, durante un período de semanas, meses o años. En un ejemplo, al sujeto se le administran los conjugados, anticuerpos, composiciones o agentes adicionales durante un período de al menos 30 días, tal como al menos 2 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 24 meses o al menos 36 meses.

En algunas realizaciones, un agente terapéutico desvelado que se administra puede administrarse por vía intravenosa, por vía subcutánea o mediante otro modo a diario o múltiples veces por semana durante un período de tiempo, seguido de un período sin tratamiento, después, el ciclo se repite. En algunas realizaciones, el período inicial de tratamiento (por ejemplo, la administración del agente terapéutico a diario o múltiples veces por semana) es de 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas o 12 semanas. En una realización relacionada, el período sin tratamiento dura 3 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas. En determinadas realizaciones, la pauta de dosificación del agente terapéutico es a diario durante 3 días seguido de 3 días de descanso; o a diario o múltiples veces por semana durante 1 semana seguido de 3 días o 1 semana de descanso; o a diario o múltiples veces por semana durante 2 semanas seguido de 1 o 2 semanas de descanso; o a diario o múltiples veces por semana durante 3 semanas seguido de 1, 2 o 3 semanas de descanso; o a diario o múltiples veces por semana durante 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 semanas seguido de 1, 2, 3 o 4 semanas de descanso.

En realizaciones adicionales, los anticuerpos, composiciones y conjugados que se unen específicamente a TEM8 pueden usarse para disminuir la unión de PA antrácico a una célula. Por ejemplo, una cantidad eficaz de los anticuerpos, composiciones y conjugados proporcionados puede incubarse con una célula en condiciones suficientes para formar un complejo inmunitario con TEM8, disminuyendo de este modo la unión de PA antrácico a la célula. En algunos ejemplos, puede administrarse una cantidad eficaz de los anticuerpos, composiciones y conjugados que se unen específicamente a TEM8 a un sujeto para disminuir la unión de PA antrácico a una célula en el sujeto. Los sujetos adecuados pueden incluir aquellos diagnosticados o en riesgo de desarrollar infección antrácica o en los que se sospecha exposición al ántrax.

La administración de los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, conjugados, linfocitos T CAR o composiciones puede ir acompañada de la administración de otros agentes antineoplásicos o antiangiogénicos o tratamientos terapéuticos (tales como la resección quirúrgica de un tumor o la radioterapia). Por ejemplo, antes, durante o después de la administración de una cantidad terapéutica de los anticuerpos o conjugados, el sujeto puede recibir una o más terapias adicionales. En un ejemplo, el sujeto recibe uno o más tratamientos para extirpar o reducir el tumor o la angiogénesis patológica antes de la administración de una cantidad terapéutica de uno o más agentes para el tratamiento del tumor o la angiogénesis patológica. Por ejemplo, el agente adicional puede incluir, pero sin limitación, un agente quimioterápico, un agente antiangiogénico o una combinación de los mismos. En otro ejemplo, al menos parte del tumor se extirpa quirúrgicamente o de otro modo, o se reduce en tamaño o volumen antes de administrar la cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o conjugado.

Los ejemplos particulares de agentes terapéuticos adicionales que pueden usarse incluyen agentes de unión a microtúbulos, intercaladores o agentes de entrecruzamiento de ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, inhibidores de la transcripción de ADN y ARN, anticuerpos, enzimas, inhibidores enzimáticos, reguladores génicos e inhibidores de la angiogénesis. Estos agentes (que se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz) y los tratamientos pueden usarse solos o en combinación. Por ejemplo, puede administrarse cualquier agente antineoplásico o antiangiogénico adecuado en combinación con los anticuerpos y conjugados que se desvelan en el presente documento. Los expertos en la materia conocen procedimientos y dosificaciones terapéuticas de dichos agentes y un médico experto puede determinarlos. En un ejemplo, el agente quimioterápico incluye 5-FU o IRT o ambos.

Agente de unión a microtúbulos se refiere a un agente que interactúa con la tubulina para estabilizar o desestabilizar la formación de microtúbulos, inhibiendo de este modo la división celular. Los ejemplos de agentes de unión a microtúbulos que pueden usarse junto con la terapia desvelada incluyen, sin limitación, paclitaxel, docetaxel, vinblastina, vindesina, vinorelbina (navelbina), las epotilonas, colchicina, dolastatina 15, nocodazol, podofilotoxina y rizoxina. También pueden usarse análogos y derivados de dichos compuestos y son conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se describen epotilonas y análogos de epotilona adecuados en la Publicación internacional N.º WO 2004/018478. Pueden usarse taxoides, tales como el paclitaxel y el docetaxel, así como los análogos del paclitaxel enseñados por las Patentes de los EE.UU. N.º 6.610.860; 5.530.020; y 5.912.264.

También son adecuados para su uso en combinación con las terapias desveladas reguladores de la transcripción de ADN y ARN adecuados, incluyendo, sin limitación, actinomicina D, daunorrubicina, doxorrubicina y derivados y análogos de las mismas. Los intercaladores y agentes de entrecruzamiento de ADN que pueden administrarse a un sujeto incluyen, sin limitación, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mitomicinas, tales como mitomicina C, bleomicina, clorambucilo, ciclofosfamida y derivados y análogos de los mismos. Los inhibidores de la síntesis de ADN adecuados para su uso como agentes terapéuticos incluyen, sin limitación, metotrexato, 5-fluoro-5'-desoxiuridina, 5-FU y análogos de los mismos. Los ejemplos de inhibidores enzimáticos adecuados incluyen, sin

limitación, camptotecina, etopósido, formestano, tricostatina y derivados y análogos de los mismos. Los compuestos adecuados que afectan a la regulación génica incluyen agentes que dan como resultado una expresión aumentada o disminuida de uno o más genes, tales como raloxifeno, 5-azacitidina, 5-aza-2'-desoxicitidina, tamoxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, mifepristona y derivados y análogos de los mismos.

5 Los ejemplos de los fármacos quimioterápicos utilizados habitualmente incluyen Adriamicina, Alkeran, Ara-C, BiCNU, Busulfán, CCNU, Carboplatino, Cisplatino, Cytosan, Daunorrubicina, DTIC, 5-FU, Fludarabina, Hydrea, Idarrubicina, Ifosfamida, Metotrexato, Mitramicina, Mitomicina, Mitoxantrona, Mostaza nitrogenada, Taxol (u otros taxanos, tales como docetaxel), Velban, Vincristina, VP-16, mientras que algunos fármacos más nuevos incluyen Gemcitabina
10 (Gemzar), Flerceptina, IRT (Camptosar, CPT-11), Leustatina, Navelbina, Rituxan STI-571, Taxotere, Topotecán (Flycamin), Xeloda (Capecitabina), Zevelin y calcitriol.

Los ejemplos no limitantes de inmunomoduladores que pueden usarse incluyen AS-101 (Wyeth-Ayerst Labs.), bropirimina (Upjohn), interferón gamma (Genentech), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y
15 macrófagos; Genetics Institute), IL-2 (Cetusor Hoffman-LaRoche), inmunoglobulina humana (Cutter Biological), IMREG (de Imreg of New Orleans, La.), SK&F 106528 y TNF (factor de necrosis tumoral; Genentech).

Por tanto, los ejemplos no limitantes de agentes quimioterápicos para su uso en combinación con los anticuerpos específicos de TEM8, fragmentos de unión a antígeno o conjugados de los mismos desvelados, incluyen agentes
20 quimioterápicos tales como erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), bortezomib (VELCADE®, Millenium Pharm.), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), suturent (SU11248, Pfizer), letrozole (FEMARA®, Novartis), mesilato de imatinib (GLEEVEC®, Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), oxaliplatino (Eloxatin®, Sanofi), 5-FU (5-fluorouracilo), leucovorina, Rapamicina (Sirolimus, GLEEVEC®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, GlaxoSmithKline), lonafarnib (SCH 66336), sorafenib (BAY43-9006, Bayer Labs.) y gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida
25 CYTOXAN®; alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; antineoplásico antifolato tal como pemetrexed (ALIMTA® Eli Lilly), aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el
30 análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (en particular criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enedina, calicamicina, calicamicina
35 gammall y calicamicina omegall; dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; así como cromóforo de neocarcinostatina y cromóforos de antibióticos de enedina relacionados con cromoproteína, aclacinomisin, actinomicina, antramycin, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolinodoxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidodoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiomicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales
45 como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; agentes antipararrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor del ácido fólico tal como el ácido folínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuna; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo
55 polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuna; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazona; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE™ sin Cremophor, albúmina, formulación de nanopartículas de paclitaxel
60 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, 111) y doxetaxel TAXOTERE® (Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; tenipósido; edatraxato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

Los ejemplos no limitantes de agentes antiangiogénicos incluyen moléculas, tales como proteínas, enzimas, polisacáridos, oligonucleótidos, ADN, ARN y vectores recombinantes, y moléculas pequeñas que actúan para reducir o incluso inhibir el crecimiento de los vasos sanguíneos. Los ejemplos de inhibidores de la angiogénesis adecuados incluyen, sin limitación, angiostatina K1-3, estaurosporina, genisteína, fumagilina, medroxiprogesterona, suramina, interferón alfa, inhibidores de la metaloproteínasa, factor plaquetario 4, somatostatina, trombospondina, endostatina, talidomida y derivados y análogos de los mismos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente antiangiogénico es un anticuerpo que se une específicamente a VEGF (por ejemplo, AVASTIN®, Roche) o un receptor de VEGF (por ejemplo, un anticuerpo VEGFR2). En un ejemplo, el agente antiangiogénico incluye un anticuerpo VEGFR2 o DMXAA (también conocido como Vadimezan o ASA404; disponible en el mercado, por ejemplo, de Sigma Corp., St. Louis, MO) o ambos. Los ejemplos de inhibidores de cinasas incluyen GLEEVAC®, IRESSA® y TARCEVA® que evitan la fosforilación y la activación de factores de crecimiento. Los anticuerpos que pueden usarse incluyen HERCEPTIN® y AVASTIN® que bloquean factores de crecimiento y la vía angiogénica.

En algunos ejemplos, el agente adicional es un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, 3F8, Abagovomab, Adecatumumab, Afutuzumab, Alacizumab, Alemtuzumab, pentetato de Altumomab, Anatumomab mafenatox, Apolizumab, Arcitumomab, Bavixumab, Bectumomab, Belimumab, Besilesomab, Bevacizumab, Bivatuzumab mertansina, Blinatumomab, Brentuximab vedotina, Cantuzumab mertansina, Capromab pendetida, Catumaxomab, CC49, Cetuximab, Citatuzumab bogatox, Cixutumumab, Clivatuzumab tetraxetán, Conatumumab, Dacetuzumab, Detumomab, Ecomeximab, Eculizumab, Edrecolomab, Epratuzumab, Ertumaxomab, Etaracizumab, Farletuzumab, Figitumumab, Galiximab, Gemtuzumab ozogamicina, Girentuximab, Glembatumumab vedotina, Ibritumomab tiuxetano, Igovomab, Imciromab, Intetumumab, Inotuzumab ozogamicina, Ipilimumab, Iratumumab, Labetuzumab, Lexatumumab, Lintuzumab, Lorvotuzumab mertansina, Lucatumumab, Lumiliximab, Mapatumumab, Matuzumab, Mepolizumab, Metelimumab, Milatuzumab, Mitumomab, Morolimumab, Nacolomab tafenatox, Naptumomab estafenatox, Necitumumab, Nimotuzumab, Nofetumomab merpentano, Ofatumumab, Olaratumab, Oportuzumab monatox, Oregovomab, Panitumumab, Pentumomab, Pertuzumab, Pintumomab, Pritumumab, Ramucirumab, Rilotumumab, Rituximab, Robatumumab, Satumomab pendetida, Sibrotuzumab, Sonepcizumab, sorafenib, sunitinib, Tacatumumab tetraxetano, Taplitumomab paptax, Tenatumomab, TGN1412, Ticilimumab (= tremelimumab), Tigatuzumab, TNX-650, Trastuzumab, Tremelimumab, Tucotuzumab celmoleucina, Veltuzumab, Volociximab, Votumumab, Zalutumumab.

Otro tratamiento común para algunos tipos de cáncer es el tratamiento quirúrgico, por ejemplo, la resección quirúrgica del cáncer o una parte del mismo. Otro ejemplo de tratamiento es la radioterapia, por ejemplo, la administración de material radiactivo o energía (tal como la terapia de haz externo) al sitio tumoral para ayudar a erradicar el tumor o encogerlo antes de la resección quirúrgica.

Otros agentes terapéuticos, por ejemplo, agentes antitumorales, que pueden o no pertenecer a una o más de las clasificaciones anteriores, también son adecuados para la administración en combinación con las terapias desveladas. A modo de ejemplo, dichos agentes incluyen adriamicina, apigenina, rapamicina, zebularina, cimetidina y derivados y análogos de los mismos.

Pueden usarse pautas de preparación y dosificación para el agente adicional de acuerdo con las instrucciones del fabricante o según lo determine empíricamente el experto. También se describen pautas de preparación y dosificación para dicha quimioterapia en *Chemotherapy Service*, (1992) Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

La terapia de combinación puede proporcionar sinergia y demostrar sinergia, es decir, el efecto conseguido cuando los principios activos se utilizan juntos es superior a la suma de los efectos que son resultado del uso de los compuestos por separado. Puede conseguirse un efecto sinérgico cuando los principios activos: (1) se coformulan y se administran, o se entregan, simultáneamente en una formulación de dosificación unitaria; (2) se entregan de manera alternada o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) mediante alguna otra pauta. Cuando se entregan de manera alternada, puede conseguirse un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o se entregan secuencialmente, por ejemplo, mediante diferentes inyecciones en jeringuillas separadas. En general, durante la alternancia, se administra secuencialmente una dosificación eficaz de cada principio activo, es decir, en serie, mientras que en la terapia de combinación, se administran juntas dosificaciones eficaces de dos o más principios activos.

G. Composiciones

Se proporcionan composiciones que incluyen uno o más de los conjugados, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno desvelados que se unen específicamente a TEM8 o moléculas de ácido nucleico o CAR, en un vehículo (tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable). Las composiciones pueden prepararse en formas de dosificación unitarias para la administración a un sujeto. La cantidad y el momento de la administración quedan a discreción del médico especialista para conseguir el resultado deseado. Las composiciones pueden formularse para la administración sistémica (tal como intravenosa) o local (tal como intratumoral). En un ejemplo, el anticuerpo que se une específicamente a TEM8 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, o conjugado incluyendo un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de este tipo, se formula la para administración parenteral, tal como la

administración intravenosa. Se usan composiciones que incluyen un conjugado, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se desvela en el presente documento, por ejemplo, para el tratamiento y la detección de un tumor, por ejemplo, un tumor que se produce en el cáncer de mama, colorrectal, de pulmón o de piel. En algunos ejemplos, las composiciones son útiles para el tratamiento o la detección de un carcinoma. Las composiciones que incluyen un conjugado, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se desvelan en el presente documento también se usan, por ejemplo, para la detección de la angiogénesis patológica. Las composiciones que incluyen un conjugado, también se usa anticuerpo o fragmento de unión a antígeno como se desvela en el presente documento, por ejemplo, para inhibir la unión de PA antrácico a TEM8.

Las composiciones para la administración pueden incluir una solución del conjugado, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo acuoso. Puede usarse una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, solución salina tamponada y similares. Estas soluciones son estériles y generalmente están libres de materia no deseada. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas. Las composiciones pueden contener sustancias adyuvantes farmacéuticamente aceptables necesarias para aproximar las condiciones fisiológicas tales como agentes de ajuste del pH y tamponadores, agentes de ajuste de la toxicidad, y similares, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o conjugado en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará principalmente basándose en los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y con las necesidades del sujeto. Los procedimientos reales de preparación de dichas formas farmacéuticas son conocidos o serán evidentes, para los expertos en la materia.

Una composición típica para la administración intravenosa incluye de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg/kg de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o conjugado por sujeto por día (o la dosis correspondiente de un conjugado que incluye el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno). Los procedimientos reales para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los expertos en la materia y se describen con más detalle en publicaciones tales como *Remington's Pharmaceutical Science*, 19^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1995). En algunas realizaciones, la composición puede ser una formulación líquida que incluye uno o más anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno (tales como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a TEM8), en un intervalo de concentraciones de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, o de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, o de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, o de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, o de aproximadamente 0,5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, o de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml.

Los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno o conjugados pueden proporcionarse en forma liofilizada y rehidratarse con agua estéril antes de la administración, aunque también se proporcionan en soluciones estériles de concentración conocida. La solución de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o conjugado se añade después a una bolsa de infusión que contiene cloruro de sodio al 0,9 %, USP y en algunos casos se administra a una dosis de 0,5 a 15 mg/kg de peso corporal. Hay disponible experiencia considerable en la técnica en la administración de fármacos de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno y conjugado; por ejemplo, los fármacos de anticuerpos se han comercializado en los EE.UU. desde la aprobación de RITUXAN® en 1997. Los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno y conjugados pueden administrarse mediante infusión lenta, en lugar de un impulso o bolo intravenoso. En un ejemplo, se administra una dosis de carga más alta, con dosis de mantenimiento posteriores, que se administran a un nivel más bajo. Por ejemplo, puede infundirse una dosis de carga inicial de 4 mg/kg de anticuerpo o fragmento de unión a antígeno (o la dosis correspondiente de un conjugado que incluya el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno) durante un período de aproximadamente 90 minutos, seguida de dosis de mantenimiento semanales durante 4-8 semanas de 2 mg/kg infundidas durante un período de 30 minutos si la dosis previa fue bien tolerada.

Pueden prepararse formulaciones parenterales de liberación controlada en forma de implantes, inyecciones oleosas o sistemas de partículas. Para obtener una visión general de los sistemas de entrega de proteínas, véase Banga, A.J., *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems*, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995). Los sistemas de partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas. Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica, tal como una citotoxina o un fármaco, como núcleo central. En las microesferas, el producto terapéutico se dispersa por toda la partícula. Las partículas, microesferas y microcápsulas menores de aproximadamente 1 µm generalmente se denominan nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente. Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 µm, por lo que solo se administran nanopartículas por vía intravenosa. Las micropartículas tienen normalmente aproximadamente 100 µm de diámetro y se administran por vía subcutánea o intramuscular. Véase, por ejemplo, Kreuter, J., *Colloidal Drug Delivery Systems*, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, NY, págs. 219-342 (1994); y Tice y Tabibi, *Treatise on Controlled Drug Delivery*, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. Nueva York, NY, págs. 315-339, (1992).

Pueden usarse polímeros para la liberación controlada por iones de las composiciones de anticuerpo o fragmento de

unión a antígeno o conjugado que se desvelan en el presente documento. Se conocen en la técnica diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en la entrega controlada de fármacos (Langer, *Accounts Chem. Res.* 26: 537-542, 1993). Por ejemplo, el copolímero de bloque, poloxámero 407, existe como un líquido viscoso pero móvil a bajas temperaturas, pero forma un gel semisólido a la temperatura corporal. Se ha demostrado que es un vehículo eficaz para la formulación y la entrega sostenida de interleucina-2 y ureasa recombinantes (Johnston et al., *Pharm. Res.* 9: 425-434, 1992; y Pec et al., *J. Parent. Sci. Tech.* 44 (2): 58-65, 1990). Como alternativa, se ha utilizado hidroxipatita como microvehículo para la liberación controlada de proteínas (Ijntema et al., *Int. J. Pharm.* 112: 215-224, 1994). En otro aspecto más, se usan liposomas para la liberación controlada, así como para el direccionamiento farmacológico del fármaco encapsulado en lípidos (Betageri et al., *Liposome Drug Delivery Systems*, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993)). Se conocen numerosos sistemas adicionales para la entrega controlada de proteínas terapéuticas (véase la Patente de los EE.UU. N.º 5.055.303; Patente de los EE.UU. N.º 5.188.837; Patente de los EE.UU. N.º 4.235.871; Patente de los EE.UU. N.º 4.501.728; Patente de los EE.UU. N.º 4.837.028; Patente de los EE.UU. N.º 4.957.735; Patente de los EE.UU. N.º 5.019.369; Patente de los EE.UU. N.º 5.055.303; Patente de los EE.UU. N.º 5.514.670; Patente de los EE.UU. N.º 5.413.797; Patente de los EE.UU. N.º 5.268.164; Patente de los EE.UU. N.º 5.004.697; Patente de los EE.UU. N.º 4.902.505; Patente de los EE.UU. N.º 5.506.206; Patente de los EE.UU. N.º 5.271.961; Patente de los EE.UU. N.º 5.254.342 y Patente de los EE.UU. N.º 5.534.496).

En algunos ejemplos, a un sujeto se le administra el ADN que codifica el anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno del mismo, para proporcionar la producción de anticuerpos *in vivo*, por ejemplo, usando la maquinaria celular del sujeto. La inmunización mediante construcciones de ácido nucleico es bien conocida en la técnica y se enseña, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N.º 5.643.578 y la Patente de los EE.UU. N.º 5.593.972 y la Patente de los EE.UU. N.º 5.817.637. La Patente de los EE.UU. N.º 5.880.103 describe varios procedimientos de entrega de ácidos nucleicos que codifican un organismo. Los procedimientos incluyen la entrega liposómica de los ácidos nucleicos. Dichos procedimientos pueden aplicarse a la producción de un anticuerpo, o fragmentos de unión de anticuerpo del mismo, por un experto habitual en la materia.

Un enfoque para la administración de ácidos nucleicos es la administración directa con ADN plasmídico, tal como con un plásmido de expresión de mamífero. La secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo desvelado, o fragmentos de unión de anticuerpo del mismo, puede ponerse bajo el control de un promotor para aumentar la expresión.

En otro enfoque para el uso de ácidos nucleicos, un anticuerpo desvelado, o fragmentos de unión a anticuerpo del mismo, también puede expresarse mediante hospedadores o vectores víricos o vectores bacterianos atenuados. Puede usarse el virus de la variolovacuna recombinante, el virus adenoasociado (AAV), el virus del herpes, el retrovirus, el citomegalovirus u otros vectores víricos para expresar el anticuerpo. Por ejemplo, se describen vectores del virus de la variolovacuna y protocolos de procedimiento útiles en la Patente de los EE.UU. N.º 4.722.848. El BCG (Bacilo Calmette Guérin) proporciona otro vector para la expresión de los anticuerpos desvelados (véase Stover, *Nature* 351: 456-460, 1991).

En una realización, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo desvelado o fragmentos de unión a anticuerpo del mismo, se introduce directamente en las células. Por ejemplo, el ácido nucleico puede cargarse en microesferas de oro mediante procedimientos convencionales e introducirse en la piel mediante un dispositivo tal como el cañón de genes FIELIOS™ de Bio-Rad. Los ácidos nucleicos pueden estar "desnudos", consistiendo en plásmidos bajo el control de un promotor fuerte.

Normalmente, el ADN se inyecta en el músculo, aunque también puede inyectarse directamente en otros sitios. Las dosis para inyección son por lo general de aproximadamente 0,5 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg y normalmente son de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N.º 5.589.466).

H. Kits

También se proporcionan kits. Por ejemplo, kits para detectar una célula (tal como una célula endotelial o un pericito) que expresa TEM8 en un sujeto, tratar un tumor en un sujeto o disminuir la unión de PA antrácico a una célula. Los kits incluirán normalmente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a TEM8 y/o un conjugado del mismo.

Puede incluirse más de uno de los conjugados o anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen específicamente a TEM8 en el kit. Por tanto, el kit puede incluir dos o más anticuerpos que se unen específicamente a TEM8 o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a TEM8 y un conjugado de los mismos, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, en el kit se incluye un fragmento de unión a antígeno o conjugado que incluye un fragmento de unión a antígeno, tal como un fragmento Fv. En un ejemplo, tal como para sus usos *in vivo*, el anticuerpo puede ser un fragmento scFv.

El kit puede incluir un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociado al recipiente. Los envases adecuados

incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente normalmente contiene una composición que incluye uno o más de los anticuerpos específicos de TEM8 desvelados, fragmentos de unión a antígeno o conjugados. En varias realizaciones, el recipiente puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Una etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección particular.

La etiqueta o prospecto normalmente incluirán adicionalmente instrucciones para el uso de un anticuerpo específico de TEM8 desvelado o fragmentos del mismo, o conjugados del mismo, por ejemplo, en un procedimiento para tratar o prevenir un tumor. El prospecto normalmente incluye instrucciones habitualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias en referencia al uso de dichos productos terapéuticos. Los materiales de instrucción pueden estar escritos, en forma electrónica (tal como un disquete de ordenador o disco compacto) o pueden ser visuales (tales como archivos de video). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación particular para la que se diseña el kit. Por tanto, por ejemplo, el kit puede contener adicionalmente medios de detección de un marcador (tal como sustratos enzimáticos para marcadores enzimáticos, conjuntos de filtros para detectar marcadores fluorescentes, marcadores secundarios apropiados tales como un anticuerpo secundario o similares). Los kits pueden incluir adicionalmente tampones y otros reactivos utilizados habitualmente para la puesta en práctica de un procedimiento particular. Dichos kits y contenidos apropiados son bien conocidos por los expertos en la materia.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar características particulares de determinadas realizaciones, pero el alcance de las reivindicaciones no debe limitarse a las características ejemplificadas.

Ejemplo 1

Anticuerpos específicos de TEM8

Este ejemplo ilustra el aislamiento de un panel de anticuerpos anti-TEM8 completamente humanos de una biblioteca scFv de presentación de levadura sin tratar humana y la caracterización de esos anticuerpos. La estrategia de selección incluyó la exploración en serie de las bibliotecas en células de mamífero transfectadas con TEM8 y proteína TEM8-ED recombinante purificada derivada de células de mamífero y dio como resultado la identificación de cuatro anticuerpos TEM8, denominados m825, m822, m830 y m863.

Se identificaron cuatro anticuerpos monoclonales completamente humanos, m822, m825, m830 y m863 a partir de una biblioteca de scFv de presentación de levadura sin tratar humana mediante clasificación, detección y maduración de afinidad contra TEM8 humano y de ratón. Los anticuerpos contra TEM8 se identificaron a partir de una exploración de biblioteca (véase Puri et al., *MAbs*. 5: 533-9, 2013 para obtener una descripción de la biblioteca). Las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y ligera, así como las CDR de la cadena pesada y ligera (definidas por IMGT) de los anticuerpos identificados se proporcionan en la Tabla 3, a continuación.

Se usaron proteínas recombinantes de ectodominio TEM8 humano y de ratón como diana para la selección. En la primera ronda de selección, se incubaron aproximadamente 5×10^{10} células de la biblioteca de anticuerpos sin tratar con 10 µg de proteína TEM8 humana biotinilada en 50 ml de albúmina sérica bovina (BSA)-solución salina tamponada con fosfato (PBS) al 0,1 %, denominada PBSA, a temperatura ambiente durante 2 horas con rotación suave. Después, la mezcla se lavó tres veces con PBSA al 0,1 % para retirar los fragmentos de anticuerpo no unidos. Se incubó posteriormente TEM8 biotinilada junto con fragmentos de anticuerpo unidos con 100 µl de microperlas conjugadas con estreptavidina (Milenvi Biotec, Auburn, CA) y se cargaron en el sistema AutoMACS para su clasificación. Se recogieron las células que presentaban fragmentos de anticuerpos con alta afinidad para TEM8 y después se amplificaron en medio SDCAA (20 g de dextrosa, 6,7 g de base de nitrógeno de levadura Difco sin aminoácidos, 5 g de Bacto aminoácidos, 5,4 g Na_2HPO_4 y 8,56 g NaH_2PO_4 . Se disolvió H_2O en 1 l de agua destilada) a 250 rpm a 30 °C durante 24 horas. Después de eso, el cultivo se indujo en medio SGCAA (20 g de galactosa, 20 g de rafinosa, 1 g de dextrosa, 6,7 g de base de nitrógeno de levadura Difco sin aminoácidos, 5 g de Bacto aminoácidos, 5,4 g Na_2HPO_4 y 8,56 g NaH_2PO_4 . Se disolvió H_2O en 1 l de agua destilada) a 250 rpm a 20 °C durante 18 horas. El conjunto obtenido se sometió a otra ronda de selección para su unión al TEM8 humano recombinante biotinilado. Para garantizar una diversidad suficiente de fragmentos de anticuerpos para las rondas segunda y tercera de detección, se usó 100 veces el tamaño del grupo de la ronda de clasificación anterior como el número de células de entrada.

Para la tercera ronda de selección, se usó TEM8 humano recombinante fusionado con Fc. La detección se realizó de manera similar a las dos rondas de selección anteriores hacia TEM8 humano. Por último, los fragmentos de anticuerpos que estaban unidos a TEM8 humano se extrajeron mediante microperlas conjugadas con proteína G. Las células de levadura que expresaban fragmentos de anticuerpos que poseían una afinidad de unión alta al TEM8 humano se recogieron y caracterizaron adicionalmente.

Tabla 3. Secuencia proteínica de los dominios VH y VL de los anticuerpos m825, m822, m830 y m863 (con las CDR de IMGT en negrita).

Anticuerpo	Secuencia proteínica (CDR subrayadas)	
m825	VH	QVQLVQSGAEVKKPGTSVKVSCKVPGYTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG GIPIFGTTNYAQKFQGRVTITGEESTSTVYMELSSLRSED TAVYYC CARDT DYMF DYWGQGL LVTVSS (SEQ ID NO: 1)
	VL	SSELTQDPVVSVALGETVSITCQGDNL RDFY ASWYQQKPGQAPLLVMYG KNRR PSGIPDRFSGSTSGNTLSLTITGAQAED EADYYC SSRDNSKHV VFGG GTKVTVL (SEQ ID NO: 2)
m822	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG GIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYC CARDT DYMF DYWGQGL LVTVSS (SEQ ID NO: 3)
	VL	SSELTQDPVVSVALGETVSITCQGDNL RDFY ASWYQQKPGQAPLLVMYG KNRR PSGIPDRFSGSTSGNTLSLTITGAQAED EADYYC SSRDNSKHV VFGG GTKVTVL (SEQ ID NO: 4)
m830	VH	EVQLVESGGGVVQPGRSVRLSCAASG FTFSTY TMHWVRQAPGKGLEWV AII NDGS NKYYADPVRGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAED TAVYYC VR GSSWY RGNW FDPW GQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 5)
	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIACRASQTISRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAA SSLQSGVSSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQ PEDFATYFCQQTYSPPITFGQ GTR LE IKR (SEQ ID NO: 6)
m863	VH	EVQLVETGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWRQAPGQGLEW MGWINPTSGSTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSGLRSD DTAVYYC VRDPGSPKWLA FDPWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 7)
	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS RAIS RYLNWYQQKPGKAPKLLIY AAS SLQSGVSSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQ PEDFATYFCQQTYSPPITFGQ GTR LE IKR (SEQ ID NO: 8)

- 5 La afinidad de unión de la interacción del anticuerpo m822, m825, m830 y m863 con TEM8 se sometió a ensayo mediante resonancia de plasmón superficial. El ensayo se realizó en un instrumento Biacore sustancialmente como se describe (véase, por ejemplo, Feng et al., *Mol Cancer Ther.* Enero de 2006; 5 (1): 114-20) usando a para los anticuerpos m822, m825, m830 y m863 en formato de IgG1 y ectodominio TEM8 humano recombinante. La K_D aparente para el anticuerpo m822, m825, m830 y m863 de unión a TEM8 determinada mediante estos ensayos se
- 10 presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Afinidades de unión de los anticuerpos contra TEM8 medidas mediante resonancia de plasmón superficial

Anticuerpo	K_D Calculada (M)
m822	$3,5 \times 10^{-8}$
m825	$3,4 \times 10^{-11}$
m830	$1,2 \times 10^{-8}$
m863	$1,2 \times 10^{-9}$

Los anticuerpos m825, m822, m830 y m863 se convirtieron en IgG1 humana de acuerdo con procedimientos convencionales (véase, por ejemplo, Zhu et al., *J Virol.* Enero de 2006; 80 (2): 891-9).

Se realizaron ensayos de detección usando los anticuerpos m825, m822, m830 y m863 en formato de IgG1 humana para confirmar que estos anticuerpos pueden unirse con alta afinidad a TEM8 humano y de ratón en forma soluble y también a las formas nativas de la superficie celular, pero no a las formas de CMG2 humano o de ratón, un segundo receptor para la proteína de la toxina antrácica (ANTXR2). Los ensayos de detección se realizaron sustancialmente como se describe en Chaudhary et al., *Cancer Cell*, 21: 212-226, 2012 y las Pub. PCT N.º WO2012174160, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento en su totalidad. En resumen, se incubaron células de ovario de hámster chino (CHO) o células 293 (293) de riñón embrionario humano que expresaban TEM8 humano (hTEM8) o CMG2 humano (hCMG2) con el anticuerpo m825, m822, m830 o m863 y la unión se sometió a ensayo usando análisis por FACS. Los resultados muestran que cada uno de los anticuerpos m825, m822, m830 y m863 se unen a hTEM8 en la superficie celular, pero no a hCMG2 (véanse las FIG. 1A y 1B).

Los anticuerpos m825, m822, m830 y m863 también se sometieron a ensayo para determinar si podían inhibir la unión de la subunidad del antígeno protector (PA) de la toxina antrácica a TEM8 de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente (Chaudhary et al., *Cancer Cell*, 21: 212-226, 2012 y la Pub. PCT N.º WO2012174160, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento en su totalidad). Cada uno de los anticuerpos m825, m822, m830 y m863 inhibió la unión (PA) a TEM8.

Los anticuerpos m825, m822, m830 y m863 también se sometieron a ensayo para determinar si podían usarse para marcar vasos tumorales. Se realizaron ensayos de tinción de inmunofluorescencia para determinar si el anticuerpo m825 en formato de IgG1 humana (m825-IgG1 humano) marcaría específicamente vasos sanguíneos tumorales (FIG. 2). Los ensayos se realizaron sustancialmente como se describió anteriormente (Chaudhary et al., *Cancer Cell*, 21: 212-226, 2012 y las Pub. PCT N.º WO2012174160, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento en su totalidad). En resumen, a ratones TEM8 KO de tipo silvestre (WT) e inactivados para TEM8 se les administraron células DLD-1 por vía subcutánea y se permitió que se desarrollara un tumor de xenoinjerto. Se obtuvo una muestra del tumor y se tiñó con anticuerpo CD31 (específico para vasos sanguíneos) y el anticuerpo m825-IgG1 humano. Como se ilustra en la FIG. 2, el m825-IgG1 humano tiñó específicamente vasos tumorales. Este resultado indica que los anticuerpos contra TEM8 identificados pueden usarse como reactivos de diagnóstico para la detección de vasos sanguíneos tumorales.

Se realizaron estudios en animales para demostrar que los anticuerpos inhiben el crecimiento tumoral *in vivo*.

En primer lugar, se sometió a ensayo el anticuerpo m825-IgG1 humano para la inhibición de xenoinjertos de células de melanoma UACC cultivados por vía subcutánea en ratones atímicos desnudos. El procedimiento de ensayo utilizado fue sustancialmente de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente (Chaudhary et al., *Cancer Cell*, 21: 212-226, 2012 y las Pub. PCT N.º WO2012174160, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento en su totalidad). En resumen, se administraron anticuerpos m825-IgG1 humanos, IgG de control o vehículo de control (PBS), por vía IP a los ratones a una dosis de 20 o 40 mg/kg comenzando 7 días después de la inoculación de los ratones con las células UACC (véanse las flechas que indican los días de tratamiento en la figura 3). El tratamiento con m825-IgG1 humano redujo significativamente el volumen tumoral en el curso del experimento en comparación con los controles (FIG. 3).

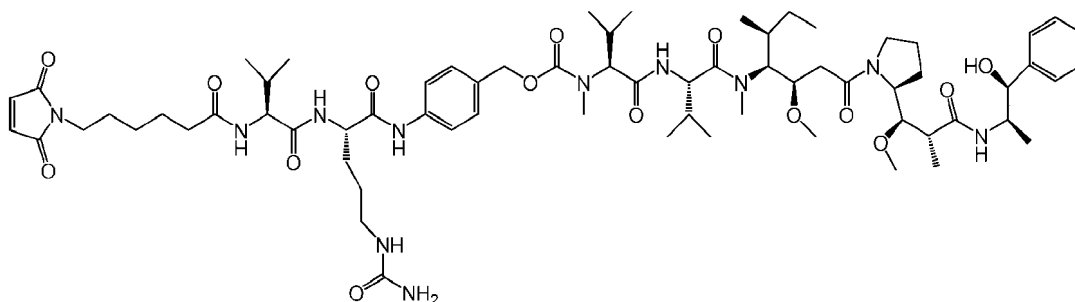
Adicionalmente, se sometió a ensayo m825-IgG1 humano para determinar la inhibición de xenoinjertos de células de cáncer de colon HCT-116 cultivadas por vía subcutánea en ratones atímicos desnudos. El procedimiento de ensayo utilizado se realizó sustancialmente de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente (Chaudhary et al., *Cancer Cell*, 21: 212-226, 2012 y las Pub. PCT N.º WO2012174160, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento en su totalidad). En resumen, se administraron anticuerpos m825-IgG1 humanos, IgG de control o vehículo de control (PBS), por vía IP a los ratones a una dosis de 15 mg/kg después de la inoculación de los ratones con las células HCT-116 (véanse las flechas que indican los días de tratamiento en la FIG. 4). El tratamiento con m825-IgG1 humano redujo significativamente el volumen tumoral en el curso del experimento en comparación con los controles (FIG. 4).

Adicionalmente, los anticuerpos m825, m822, m830 y m863 en formato de IgG1 humana se sometieron a ensayo para determinar la inhibición de xenoinjertos de células de melanoma UACC cultivados por vía subcutánea en ratones atímicos desnudos (FIG. 5). El procedimiento de ensayo utilizado fue sustancialmente de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente (Chaudhary et al., *Cancer Cell*, 21: 212-226, 2012 y las Pub. PCT N.º WO2012174160, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento en su totalidad). En resumen, se administró anticuerpo m825, m822, m830 o m863, o control de vehículo (PBS), por vía IP a los ratones a una dosis de 15 mg/kg el séptimo día después de la inoculación de los ratones con las células UACC. El tratamiento con los anticuerpos m825, m822, m830 y m863 redujo significativamente el volumen tumoral en el curso del experimento en comparación con los controles (FIG. 5).

Adicionalmente, se realizaron ensayos para determinar si los anticuerpos anti-TEM8 podrían inhibir la metástasis tumoral en un modelo animal (FIG. 6). Se inyectaron ratones atímicos desnudos por vía intraesplénica con células de

cáncer de colon humano. Después, los ratones se trataron con el anticuerpo m830-IgG1 humano y se midió la metástasis del cáncer de colon al hígado de los ratones usando bioluminiscencia. Como se muestra en las FIG. 6 A y 6B, el tratamiento con el anticuerpo m830-IgG1 humano redujo drásticamente la metástasis en este modelo animal.

- 5 Se generó un conjugado anticuerpo-fármaco que incluía el anticuerpo m825 (en formato de IgG1 humana) conjugado con MMAE (m825-MMAE) sustancialmente de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de los EE.UU. N.º 2011/0268751, 2008/0305044, 2007/0258987). En resumen, se redujeron parcialmente enlaces disulfuro intercatenarios del anticuerpo m825 purificado con clorhidrato de tris (2-carboxietil)-fosfina (TCEP FICL) para formar grupos tiol. La reacción se realizó a 25 °C durante 1,5 horas
- 10 con una concentración de TCEP de 2,2 equivalentes molares con respecto al anticuerpo m825. El anticuerpo m825 parcialmente reducido se incubó con la toxina MMAE unida a una unidad intermedia, un sitio de escisión del péptido Val-Cit y un espaciador establecido como:



- 15 La reacción se realizó a 25 °C durante 1 hora con la concentración del compuesto MMAE de 5,5 equivalentes molares con respecto al anticuerpo m825. Se incluyó DMSO en la reacción al 10,5 % v/v para mantener la solubilidad del enlazador MMAE. La reacción de conjugación se interrumpió después mediante la adición de una relación molar 10x de N-acetil-L-cisteína con respecto al anticuerpo m825 a 25 °C durante 15 minutos. El conjugado
- 20 m825-MMAE resultante se sometió a intercambio de tampón usando procedimientos convencionales y se concentró según fue necesario.

- El conjugado m825-MMAE se sometió a ensayo para determinar la unión a TEM8 de la superficie celular mediante ensayo de unión a células CHO que expresaban TEM8 humano. Como se muestra en la FIG. 7, el conjugado m825-MMAE se unió específicamente a las células CHO que expresaban TEM8, pero no a las células CHO que carecían
- 25 de expresión de TEM8.

- La selectividad del conjugado m825-MMAE para células que expresaban TEM8 se sometió a ensayo *in vitro* (FIG. 8). Se trataron células HEK 293 (control) o células HEK 293 que expresaban TEM8 con MMAE sola, anticuerpo humano m825-IgG1 o el conjugado m825-MMAE. Como se muestra en la FIG. 8, la toxina MMAE sola era citotóxica hacia las células HEK 293 independientemente de la expresión de TEM8, mientras que el conjugado m825-MMAE era
- 30 citotóxico solamente hacia las células HEK-293 que expresaban TEM8.

- Para someter a ensayo adicionalmente la actividad antineoplásica de los anticuerpos anti-TEM8 y conjugados anticuerpo-fármaco de los mismos, se sometieron a ensayo los efectos de estos compuestos sobre el crecimiento de xenoinjerto en ratones atímicos desnudos (FIG. 9 y 10). Se cultivaron xenoinjertos de cáncer de colon humano (células HCT116) por vía subcutánea en ratones atímicos desnudos. Los ratones se trataron con el conjugado m825-MMAE a una concentración de 1, 3, 10 o 30 mg/kg, o con anticuerpo m825-IgG1 humano solo a una concentración
- 35 de 10 o 30 mg/kg, dos veces por semana durante tres semanas. Los resultados indican que tanto el anticuerpo m825-IgG1 humano como el conjugado m825-MMAE redujeron satisfactoriamente el crecimiento tumoral en este modelo animal. Adicionalmente, a dosis comparables, el conjugado m825-MMAE fue más eficaz para reducir el crecimiento tumoral que el anticuerpo m825 solo.

- Adicionalmente, se cultivaron xenoinjertos de cáncer de ovario (células OVCAR3) por vía subcutánea en ratones atímicos desnudos. Los ratones se trataron con el conjugado m825-MMAE (1, 3 o 10 mg/kg), anticuerpo m825-IgG1 humano solo (10 mg/kg) o MMAE sola (0,2 mg/kg), dos veces por semana durante tres semanas y media. Los resultados muestran que el conjugado m825-MMAE (a 3 y 10 mg/kg) redujo el crecimiento del xenoinjerto en este
- 45 modelo animal. Adicionalmente, a dosis comparables, el conjugado m825-MMAE fue más eficaz para reducir el crecimiento tumoral que el anticuerpo m825 solo.

- Estos ensayos *in vivo* ilustran que los anticuerpos m825, m822, m830 y m863 y conjugados anticuerpo-fármaco de los mismos, pueden usarse como agentes terapéuticos contra el cáncer.

Ejemplo 2

55

Detección de una célula endotelial que expresa TEM8 en un ser humano

Este ejemplo describe procedimientos particulares que pueden usarse para detectar una célula endotelial que expresa TEM8 en un sujeto. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que pueden usarse procedimientos similares. Dicha detección puede realizarse, por ejemplo, antes, durante o después de tratar al sujeto (o combinación de los mismos) con un anticuerpo que se une específicamente a TEM8 o conjugado del mismo.

Un anticuerpo monoclonal específico de TEM8 (tal como, pero sin limitación, un anticuerpo monoclonal específico de TEM8 que incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 incluyendo los aminoácidos 26-33, 51-58 y 97-106 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que incluye una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 incluyendo los aminoácidos 26-31, 49-51 y 88-97 de la SEQ ID NO: 2, respectivamente) o se administra al sujeto un anticuerpo monoclonal específico de TEM8 conjugado con un marcador detectable. La administración puede conseguirse mediante cualquier procedimiento suficiente conocido en la técnica, pero normalmente la administración es intravenosa. Normalmente, el conjugado se administra como componente de una composición que incluye el conjugado y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se administra una cantidad eficaz del anticuerpo o conjugado al sujeto. La cantidad de anticuerpo o conjugado administrado es suficiente para formar un complejo inmunitario detectable con TEM8 en el sujeto. Un experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad eficaz, por ejemplo, usando ensayos rutinarios que establecen curvas de respuesta a la dosis. Además, se han proporcionado anteriormente dosificaciones de ejemplo particulares. El anticuerpo o el conjugado puede administrarse en entrega de dosis única o múltiple o a través de entrega continua durante un período de tiempo prolongado.

En el caso de un anticuerpo, el anticuerpo utilizado para la detección de angiogénesis patológica en un sujeto se detecta con un reactivo secundario (tal como un anticuerpo secundario conjugado con un marcador detectable) útil para el diagnóstico por imagen. Por ejemplo, un marcador detectable utilizado para la formación de imágenes por resonancia magnética, tal como nanocristales de óxido de hierro súper paramagnéticos. El reactivo secundario particular dependerá del tipo particular de diagnóstico por imagen utilizado, como apreciará el experto en la materia.

En el caso de un conjugado, el conjugado utilizado para la detección de angiogénesis patológica en un sujeto normalmente incluye un marcador detectable útil para el diagnóstico por imagen. Por ejemplo, un marcador detectable utilizado para la formación de imágenes por resonancia magnética, tal como nanocristales de óxido de hierro súper paramagnéticos. El marcador detectable particular dependerá del tipo particular de diagnóstico por imagen utilizado, como apreciará el experto en la materia.

La detección de la célula endotelial que expresa TEM8 se logra mediante la detección del anticuerpo o conjugado inmovilizado en el sujeto usando el procedimiento de diagnóstico por imagen correspondiente al marcador detectable utilizado. Por ejemplo, si el marcador detectable es nanocristales de óxido de hierro súper paramagnéticos, entonces los procedimientos de diagnóstico por imágenes incluirán normalmente la formación de imágenes por resonancia magnética.

Ejemplo 3**Tratamiento del cáncer en un ser humano**

Este ejemplo describe un procedimiento particular que puede usarse para tratar un tumor primario o metastásico en seres humanos mediante la administración de uno o más anticuerpos que se unen específicamente a TEM8 o un conjugado de los mismos. Aunque se proporcionan procedimientos, dosificaciones y modos de administración particulares, un experto en la materia apreciará que pueden hacerse variaciones sin afectar sustancialmente al tratamiento.

Los pacientes humanos se tratan por vía intravenosa con al menos 1 µg (tal como 0,001-1000 mg) de uno o más anticuerpos que se unen específicamente a TEM8 o un conjugado de los mismos, (por ejemplo, pero sin limitación, un anticuerpo monoclonal específico de TEM8 que incluye una región variable de la cadena pesada que incluye una H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3 incluyendo los aminoácidos 26-33, 51-58 y 97-106 de la SEQ ID NO: 1, respectivamente, y una región variable de la cadena ligera que incluye una L-CDR1, L-CDR2 y L-CDR3 incluyendo los aminoácidos 26-31, 49-51 y 88-97 de la SEQ ID NO: 2, respectivamente), por ejemplo, durante un período de al menos 1 día, 1 semana, 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos un año, al menos 2 años o al menos cinco años o más o menos tiempo. La administración del anticuerpo o conjugado puede usarse junto con la terapia normal contra el cáncer (por ejemplo, en lugar de reemplazar la terapia). Por tanto, el anticuerpo o conjugado puede añadirse a los tratamientos comunes y habituales antiangiogénicos, quimioterapia, cirugía, radioterapia (o combinación de los mismos) utilizados convencionalmente para el tipo de tumor particular. La administración del anticuerpo o conjugado puede continuar después de que se detenga la terapia habitual y puede tomarse a largo plazo (por ejemplo, durante un período de meses o años).

En resumen, el procedimiento incluye ensayos de detección para determinar si tienen un tumor, tal como un tumor

primario o metastásico. Se seleccionan sujetos que tienen un tumor. En un ensayo clínico, la mitad de los sujetos seguiría el protocolo establecido para el tratamiento del tumor (tal como una pauta antiangiogénica/quimioterapia/radioterapia/cirugía normal). La otra mitad seguiría el protocolo establecido para el tratamiento del tumor (tal como una pauta antiangiogénica/quimioterapia/radioterapia/cirugía normal) en combinación con la administración del anticuerpo o conjugado que se describe en el presente documento. En algunos ejemplos, el tumor se extirpa quirúrgicamente (en su totalidad o en parte) antes del tratamiento con el anticuerpo o el conjugado.

Exploración de sujetos

El sujeto se explora en primer lugar para determinar si tienen un tumor. Los ejemplos de procedimientos que pueden usarse para explorar para detectar tumores incluyen una combinación de ecografía, biopsia de tejido o detección de vasculatura asociada a tumor. Sin embargo, dicha exploración previa no es necesaria antes de la administración del anticuerpo o conjugado que se desvela en el presente documento.

Pretratamiento de los sujetos

El sujeto se trata antes de la administración de un anticuerpo que se une específicamente a TEM8 o conjugado del mismo. Sin embargo, dicho tratamiento previo no siempre es necesario, como puede determinar un médico experto. Por ejemplo, el tumor puede extirparse quirúrgicamente (total o parcialmente) antes de la administración de uno o más anticuerpos o conjugados. Además, el sujeto puede tratarse con un protocolo establecido para el tratamiento del tumor particular presente (tal como una pauta antiangiogénica/quimioterapia/radioterapia normal).

Administración

La administración puede conseguirse mediante cualquier procedimiento suficiente conocido en la técnica, pero normalmente la administración es intravenosa. Normalmente, el anticuerpo o conjugado se administra como componente de una composición que incluye el anticuerpo o conjugado y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se administra una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o conjugado al sujeto. La cantidad de anticuerpo o conjugado administrado es suficiente para tratar a un sujeto que tiene un tumor. Un experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad terapéuticamente eficaz, por ejemplo, usando ensayos rutinarios que establecen curvas de respuesta a la dosis. Además, se han proporcionado anteriormente dosificaciones de ejemplo particulares. El anticuerpo o conjugado puede administrarse en una entrega de dosis única, a través de entrega continua durante un período de tiempo prolongado, en un protocolo de administración repetida (por ejemplo, mediante un protocolo de administración repetida diaria, semanal o mensual).

Evaluación

Después de la administración de una o más terapias, los sujetos que tienen un tumor pueden ser controlados en cuanto al tratamiento del tumor, tal como la regresión o la reducción de la carga tumoral (por ejemplo, reducción de las lesiones metastásicas). En ejemplos particulares, los sujetos se analizan una o más veces, comenzando siete días después del tratamiento.

Los sujetos pueden ser controlados usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, puede usarse diagnóstico por imagen (tal como rayos X, exploraciones por TC, RM, ecografía, examen de fibra óptica y examen laparoscópico), así como análisis de muestras biológicas del sujeto (por ejemplo, análisis de sangre, biopsia de tejido u otras muestras biológicas), tal como el análisis del tipo de células presentes o el análisis de un marcador tumoral particular. En un ejemplo, si el sujeto tiene un tumor metastásico, la evaluación puede realizarse usando ecografía, RM o TAC y el análisis del tipo de células contenidas en una biopsia de tejido.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Los Estados Unidos de América representados por el
 Secretario, Departamento de Salud y Servicios Sociales
 BioMed Valley Discoveries, Inc.
 Dimitrov, Dimitar
 Zhu, Zhongyu
 St. Croix, Brad
 Zudaire, Enrique
 Saha, Saurabh
 Zhang, Xiaoyan
 DeCrescenzo, Gary
 Welsch, Dean

<120> ANTICUERPOS CONTRA TEM8 Y SU USO

ES 2 764 833 T3

<130> 4239-91524-02

<150> 61/889.958

<151> 11/10/2013

<160> 28

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 1

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Gly Glu Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 2

ES 2 764 833 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 117

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 3

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

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

ES 2 764 833 T3

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo
<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 764 833 T3

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

<400> 5

5

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

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

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

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

Arg 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

Val Arg Gly Ser Ser Trp Tyr Arg Gly Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> secuencia de anticuerpo

15

<400> 6

ES 2 764 833 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 7

ES 2 764 833 T3

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

<210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo
 <400> 8

ES 2 764 833 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9
<211> 1695
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

atggccacgg cggagcggag agccctcggc atcggcttcc agtggctctc tttggccact	60
ctggtgctca tctgcgccgg gcaaggggga cgcagggagg atgggggtcc agcctgctac	120
ggcggatttg acctgtactt cattttggac aaatcaggaa gtgtgctgca cactggaat	180
gaaatctatt actttgtgga acagttggct cacaaattca tcagcccaca gttgagaatg	240
tcctttattg ttttctccac ccgaggaaca accttaatga aactgacaga agacagagaa	300
caaatccgtc aaggcctaga agaactccag aaagttctgc caggaggaga cacttacatg	360
catgaaggat ttgaaagggc cagtgcagcag atttattatg aaaacagaca agggtagagg	420
acagccagcg tcatcattgc tttgactgat ggagaactcc atgaagatct ctttttctat	480
tcagagaggg aggctaatag gtctcgagat cttgggtgcaa ttgtttactg tgttggtgtg	540
aaagatttca atgagacaca gctggcccgg attgcggaca gtaaggatca tgtgtttccc	600
gtgaatgacg gctttcaggc tctgcaaggc atcatccact caattttgaa gaagtcctgc	660
atcgaaattc tagcagctga accatccacc atatgtgcag gagagtcatt tcaagttgtc	720
gtgagaggaa acggcttccg acatgcccgc aacgtggaca gggtcctctg cagcttcaag	780

ES 2 764 833 T3

```

atcaatgact cggtcacact caatgagaag cccttttctg tggaagatac ttatttactg      840
tgtccagcgc ctatcttaaa agaagttggc atgaaagctg cactccaggt cagcatgaac      900
gatggcctct cttttatctc cagttctgtc atcatcacca ccacacactg ttctgacggt      960
tccatcctgg ccatcgccct gctgacctg ttctgtctcc tagccctggc tctcctctgg     1020
tggttctggc ccctctgctg cactgtgatt atcaaggagg tccctccacc ccctgccgag     1080
gagagtgagg aagaagatga tgatggctct cctaagaaaa agtggccaac ggtagacgcc     1140
tcttattatg gtgggagagg cggtggaggc attaaaagaa tggaggttcg ttggggagaa     1200
aagggctcca cagaagaagg tgctaagttg gaaaaggcaa agaatgcaag agtcaagatg     1260
ccggagcagg aatatgaatt ccctgagccg cgaatatctc acaacaatat gcgtcggcct     1320
tcttcccccc ggaagtggta ctctccaatc aagggaaaac tcgatgcctt gtgggtccta     1380
ctgaggaaaag gatatgatcg tgtgtctgtg atgcgtccac agccaggaga cacggggcgc     1440
tgcacaaact tcaccagggt caagaacaac cagccagcca agtaccact caacaacgcc     1500
taccacacct cctcgccgcc tcctgcccc atctacactc cccacactcc tgcgccccac     1560
tgccctcccc cgccccccag cgccctacc cctcccatcc cgtccccacc ttccaccctt     1620
ccccctctc occaggctcc acctcccaac agggcacctc ctccctcccg ccctcctcca     1680
aggccttctg tctag                                     1695

```

5 <210> 10
 <211> 564
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 10

ES 2 764 833 T3

Met Ala Thr Ala Glu Arg Arg Ala Leu Gly Ile Gly Phe Gln Trp Leu
1 5 10 15

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

Glu Asp Gly Gly Pro Ala Cys Tyr Gly Gly Phe Asp Leu Tyr Phe Ile
35 40 45

Leu Asp Lys Ser Gly Ser Val Leu His His Trp Asn Glu Ile Tyr Tyr
50 55 60

Phe Val Glu Gln Leu Ala His Lys Phe Ile Ser Pro Gln Leu Arg Met
65 70 75 80

Ser Phe Ile Val Phe Ser Thr Arg Gly Thr Thr Leu Met Lys Leu Thr
85 90 95

ES 2 764 833 T3

Glu	Asp	Arg	Glu	Gln	Ile	Arg	Gln	Gly	Leu	Glu	Glu	Leu	Gln	Lys	Val	100	105	110	
Leu	Pro	Gly	Gly	Asp	Thr	Tyr	Met	His	Glu	Gly	Phe	Glu	Arg	Ala	Ser	115	120	125	
Glu	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Glu	Asn	Arg	Gln	Gly	Tyr	Arg	Thr	Ala	Ser	Val	130	135	140	
Ile	Ile	Ala	Leu	Thr	Asp	Gly	Glu	Leu	His	Glu	Asp	Leu	Phe	Phe	Tyr	145	150	155	160
Ser	Glu	Arg	Glu	Ala	Asn	Arg	Ser	Arg	Asp	Leu	Gly	Ala	Ile	Val	Tyr	165	170	175	
Cys	Val	Gly	Val	Lys	Asp	Phe	Asn	Glu	Thr	Gln	Leu	Ala	Arg	Ile	Ala	180	185	190	
Asp	Ser	Lys	Asp	His	Val	Phe	Pro	Val	Asn	Asp	Gly	Phe	Gln	Ala	Leu	195	200	205	
Gln	Gly	Ile	Ile	His	Ser	Ile	Leu	Lys	Lys	Ser	Cys	Ile	Glu	Ile	Leu	210	215	220	
Ala	Ala	Glu	Pro	Ser	Thr	Ile	Cys	Ala	Gly	Glu	Ser	Phe	Gln	Val	Val	225	230	235	240
Val	Arg	Gly	Asn	Gly	Phe	Arg	His	Ala	Arg	Asn	Val	Asp	Arg	Val	Leu	245	250	255	
Cys	Ser	Phe	Lys	Ile	Asn	Asp	Ser	Val	Thr	Leu	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	260	265	270	
Ser	Val	Glu	Asp	Thr	Tyr	Leu	Leu	Cys	Pro	Ala	Pro	Ile	Leu	Lys	Glu	275	280	285	
Val	Gly	Met	Lys	Ala	Ala	Leu	Gln	Val	Ser	Met	Asn	Asp	Gly	Leu	Ser	290	295	300	
Phe	Ile	Ser	Ser	Ser	Val	Ile	Ile	Thr	Thr	Thr	His	Cys	Ser	Asp	Gly	305	310	315	320
Ser	Ile	Leu	Ala	Ile	Ala	Leu	Leu	Ile	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	325	330	335	
Ala	Leu	Leu	Trp	Trp	Phe	Trp	Pro	Leu	Cys	Cys	Thr	Val	Ile	Ile	Lys	340	345	350	

ES 2 764 833 T3

Glu Val Pro Pro Pro Pro Ala Glu Glu Ser Glu Glu Glu Asp Asp Asp
 355 360 365
 Gly Leu Pro Lys Lys Lys Trp Pro Thr Val Asp Ala Ser Tyr Tyr Gly
 370 375 380
 Gly Arg Gly Val Gly Gly Ile Lys Arg Met Glu Val Arg Trp Gly Glu
 385 390 395 400
 Lys Gly Ser Thr Glu Glu Gly Ala Lys Leu Glu Lys Ala Lys Asn Ala
 405 410 415
 Arg Val Lys Met Pro Glu Gln Glu Tyr Glu Phe Pro Glu Pro Arg Asn
 420 425 430
 Leu Asn Asn Asn Met Arg Arg Pro Ser Ser Pro Arg Lys Trp Tyr Ser
 435 440 445
 Pro Ile Lys Gly Lys Leu Asp Ala Leu Trp Val Leu Leu Arg Lys Gly
 450 455 460
 Tyr Asp Arg Val Ser Val Met Arg Pro Gln Pro Gly Asp Thr Gly Arg
 465 470 475 480
 Cys Ile Asn Phe Thr Arg Val Lys Asn Asn Gln Pro Ala Lys Tyr Pro
 485 490 495
 Leu Asn Asn Ala Tyr His Thr Ser Ser Pro Pro Pro Ala Pro Ile Tyr
 500 505 510
 Thr Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Cys Pro Pro Pro Pro Pro Ser Ala
 515 520 525
 Pro Thr Pro Pro Ile Pro Ser Pro Pro Ser Thr Leu Pro Pro Pro Pro
 530 535 540
 Gln Ala Pro Pro Pro Asn Arg Ala Pro Pro Pro Ser Arg Pro Pro Pro
 545 550 555 560
 Arg Pro Ser Val

<210> 11
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 11

ES 2 764 833 T3

cagggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggacctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ttcctggata caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac aacaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accggggagg aatccacgag cacagtctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatacg 300
 gactacatgt ttgactactg gggccaggga accctgggtca ccgtgagctc a 351

<210> 12
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 12

tcttctgagc tgactcagga ccctgttgtg tctgtggcct tgggagagac agtcagtatc 60
 acatgccaag gagacaacct cagagacttt tatgcaagct ggtaccaaca gaagccagga 120
 caggcccctc tactagtcac gtatggtaaa aacaggcggc cctcagggat ccagaccga 180
 ttctctggct ccacctcagg aaacacactt tccttgacca tcaactggggc tcaggcggaa 240
 gatgaggetg actattactg tagctcccgg gacaacagta agcatgtggt gttcggcggg 300
 gggaccaagg tcaccgtcct a 321

<210> 13
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 13

cagggtccagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg tttctggata caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accggggacg aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatacg 300
 gactacatgt ttgactactg gggccaggga accctgggtca ccgtgagctc a 351

<210> 14
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 14

5

tcttctgagc tgactcagga ccctgttggt tctgtggcct tgggagagac agtcagtatc	60
acatgccaaag gagacaacct cagagacttt tatgcaagct ggtaccaaca gaagccagga	120
caggccccctc tactagtcac gtatggtaaa aacaggcggc cctcagggat cccagaccga	180
ttctctggct ccacctcagg aaacacactt tccttgacca tctctggggc tcaggcggaa	240
gatgaggctg actattactg tagctcccg gacaacagta agcatgtggt gttcggcggg	300
gggaccaagg tcaccgtcct a	321

<210> 15
<211> 363
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

15

<400> 15

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cgtgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt acctatacta tgcaactgggt ccgccaggct	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcaatt atctcaaagc atggaagcaa taagtactac	180
gcagaccccg tgagggggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatac acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgt acgtggcagc	300
agctggtatc gcggaaattg gttcgacccc tggggccagg gaaccctggt caccgtgagc	360
tca	363

20

<210> 16
<211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> secuencia de anticuerpo

<400> 16

ES 2 764 833 T3

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcgcttgcc gggcaagtca gaccattagt aggtatttaa attggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtctcatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag tctgcagcct	240
gaagattttg caacttattt ctgtcaacag acttacagtc ccccgatcac cttcggccaa	300
gggacacgac tggagattaa acga	324

<210> 17
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 17

gaggtgcagc tgggtggagac cggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc	60
tcttgcaagg cttctggata caccttcacc ggctactata tgcactgggt gcgacaggcc	120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacccta ccagtggtag cacaaactat	180
gcacagaagt ttcagggcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcag cacagcctac	240
atggagctga gcgggctgag atctgacgac actgccgtgt attactgtgt gagagatccg	300
ggttctccta agtggctggc cttcgacccc tggggccagg gcaccctggt caccgtgagc	360
tca	363

<210> 18
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de anticuerpo

<400> 18

gacatccagt tgacccagtc tccatcctcc ttgtctgctt ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgcc gggcaagtgc ggccattagt aggtatttaa attggtatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtctcatca	180
aggttcagtg gcagtggatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcag tctgcagcct	240
gaagattttg caacttattt ctgtcaacag acttacagtc ccccgatcac cttcggccaa	300
gggacacgac tggagattaa acgt	324

<210> 19

<211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Enlazador peptídico
 <400> 19
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 10
 <210> 20
 <211> 22
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 20
 Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro Ala Phe
 1 5 10 15
 Leu Leu Ile Pro Asp Thr
 20
 20
 <210> 21
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 21

ES 2 764 833 T3

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

<210> 22

ES 2 764 833 T3

<211> 69
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 22

```

Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala
1          5          10          15

Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly
          20          25          30

Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile
          35          40          45

Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val
50          55          60

Ile Thr Leu Tyr Cys
65

```

10 <210> 23
<211> 67
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 23

```

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
1          5          10          15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
          20          25          30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
          35          40          45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
50          55          60

Trp Val Arg
65

```

20 <210> 24
<211> 112
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 24

ES 2 764 833 T3

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 25
<211> 84
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

Phe Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro
1 5 10 15

Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu
20 25 30

Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg
35 40 45

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
50 55 60

Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn
65 70 75 80

His Arg Asn Arg

10

15

<210> 26
<211> 40
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

ES 2 764 833 T3

Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro
20 25 30

Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 27
<211> 42
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
20 25 30

Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40

<210> 28
<211> 47
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe
1 5 10 15

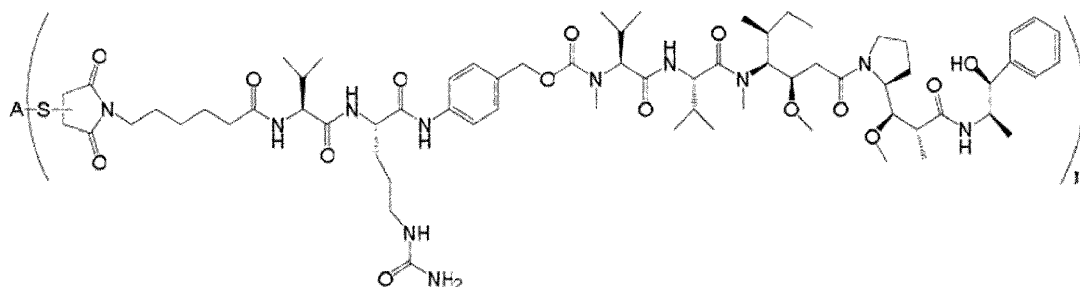
Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly

20 25 30

Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu
35 40 45

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, comprendiendo la región variable de la cadena pesada la SEQ ID NO: 1 y comprendiendo la región variable de la cadena ligera la SEQ ID NO: 2; en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a TEM8 y es neutralizante.
2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno comprende una región marco conservada humana.
3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo es una IgG.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 3, en donde el fragmento de unión a antígeno es un fragmento Fv, Fab, F(ab')₂, scFV o scFV2.
5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, conjugado con una molécula efectora o un marcador detectable.
6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 5, en donde la molécula efectora es un agente antiangiogénico, agente quimioterápico y/o toxina.
7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 6, en donde la toxina es una toxina maitansinoide o una toxina auristatina, en particular en donde la toxina maitansinoide es DM1; y/o la toxina auristatina es Monometil Auristatina E (MMAE) o Monometil Auristatina F (MMAF).
8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se conjuga con la molécula efectora mediante un enlazador.
9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 8, en donde el enlazador es un enlazador escindible, tal como un enlazador peptídico escindible selectivamente.
10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 9, en donde el enlazador es un enlazador escindible por catepsina.
11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 9, en donde el enlazador es un enlazador no escindible.
12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 11, en donde el marcador detectable es un marcador fluorescente, enzimático, de metal pesado o radiactivo.
13. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que codifica en particular un receptor de antígeno quimérico.
14. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13.
15. Una célula hospedadora, que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13 o el vector de la reivindicación 14.
16. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la célula hospedadora es un linfocito T.
17. Un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la fórmula I:



en donde A es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 2, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a TEM8;

en donde S es un átomo de azufre del anticuerpo; y

en donde n es un número entero entre 1 y 10,

y/o en donde n es un número entero par de 2 a 8, en particular en donde n es un entero par de 2 a 4.

18. Una composición, que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, molécula de ácido nucleico, vector, célula hospedadora o conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 1-17 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

19. Un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, molécula de ácido nucleico, vector, célula hospedadora, conjugado o composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-18 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto con un tumor, que comprende:

seleccionar un sujeto con un tumor o en riesgo de un tumor; y

administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, molécula de ácido nucleico, vector, célula hospedadora o composición en condiciones suficientes para formar un complejo inmunitario, en donde la formación del complejo inmunitario trata el tumor en el sujeto.

20. Un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, molécula de ácido nucleico, vector, célula hospedadora, conjugado o composición para el uso de la reivindicación 19, en donde el procedimiento comprende adicionalmente administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente adicional, en particular en donde el agente adicional es un agente antiangiogénico o en donde el agente adicional es un agente quimioterápico.

21. Un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, molécula de ácido nucleico, vector, célula hospedadora, conjugado o composición para el uso de la reivindicación 19 o 20, en donde el tumor es cáncer colorrectal, de piel, de pulmón, de mama, de próstata o de cabeza y cuello.

22. Un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, molécula de ácido nucleico, vector, célula hospedadora, conjugado o composición para el uso de la reivindicación 19 o 20, en donde el tratamiento del tumor comprende una reducción de la carga tumoral.

23. Un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, molécula de ácido nucleico, vector, célula hospedadora, conjugado o composición para el uso de la reivindicación 19 o 20, en donde el tratamiento del tumor comprende una reducción del crecimiento tumoral.

24. Un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, molécula de ácido nucleico, vector, célula hospedadora, conjugado o composición para el uso de la reivindicación 19, en donde el tumor está en un microentorno tumoral que comprende una célula con expresión aumentada en superficie celular de TEM8, en particular en donde la célula es una célula endotelial o una célula estromal.

25. Un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de una célula con expresión en superficie celular de TEM8 en un sujeto, que comprende:

poner en contacto una célula en una muestra biológica del sujeto con una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en condiciones suficientes para formar un complejo inmunitario; y

detectar la presencia del complejo inmunitario en la célula del sujeto, en donde la presencia del complejo inmunitario en la célula del sujeto indica la presencia de una célula con expresión en superficie celular de TEM8 en el sujeto.

26. Un procedimiento *in vitro* de la reivindicación 25, en donde la célula es una célula endotelial, una célula tumoral estromal y/o una célula tumoral.

27. Un procedimiento *in vitro* de la reivindicación 26, en donde la célula es una célula endotelial y en donde la detección de la presencia de la célula endotelial que expresa TEM8 en un sujeto detecta angiogénesis patológica en el sujeto.

28. Un procedimiento *in vitro* de la reivindicación 26, en donde la célula es una célula endotelial y en donde la detección de la presencia de la célula endotelial que expresa TEM8 en el sujeto detecta un tumor en el sujeto.

29. Un procedimiento *in vitro* de disminución de la unión de antígeno protector antrácico a una célula, que comprende:

poner en contacto la célula con una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en condiciones suficientes para formar un complejo inmunitario, en donde la formación del

complejo inmunitario disminuye la unión del antígeno protector antrácico a la célula.

30. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un procedimiento de detección de la presencia de una célula con expresión en superficie celular de TEM8 en un sujeto, que comprende:

poner en contacto *in vivo* una célula del sujeto con una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en condiciones suficientes para formar un complejo inmunitario; y
detectar la presencia del complejo inmunitario en la célula del sujeto, en donde la presencia del complejo inmunitario en la célula del sujeto indica la presencia de una célula con expresión en superficie celular de TEM8 en el sujeto.

31. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para el uso de la reivindicación 30, en donde la célula es una célula endotelial, una célula tumoral estromal y/o una célula tumoral.

32. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para el uso de la reivindicación 31, en donde la célula es una célula endotelial y en donde la detección de la presencia de la célula endotelial que expresa TEM8 en un sujeto detecta angiogénesis patológica en el sujeto.

33. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su uso de la reivindicación 31, en donde la célula es una célula endotelial, en donde la detección de la presencia de la célula endotelial que expresa TEM8 en el sujeto detecta un tumor en el sujeto.

34. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un procedimiento de tratamiento de un sujeto, que comprende una célula, diagnosticado o en riesgo de desarrollar infección antrácica o en el que se sospecha exposición a ántrax, mediante la disminución de la unión del antígeno protector antrácico a la célula, que comprende:

poner en contacto la célula con una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno en condiciones suficientes para formar un complejo inmunitario, en donde la formación del complejo inmunitario disminuye la unión del antígeno protector antrácico a la célula,
en donde poner en contacto la célula con una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno al sujeto, en donde la formación del complejo inmunitario disminuye la unión del antígeno protector antrácico a la célula.

35. Un kit para detectar la angiogénesis patológica en un sujeto, tratar un tumor en un sujeto o disminuir la unión del antígeno protector antrácico a una célula, que comprende un recipiente que comprende el anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, molécula de ácido nucleico, vector, célula hospedadora, conjugado o composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, e instrucciones para usar el kit.

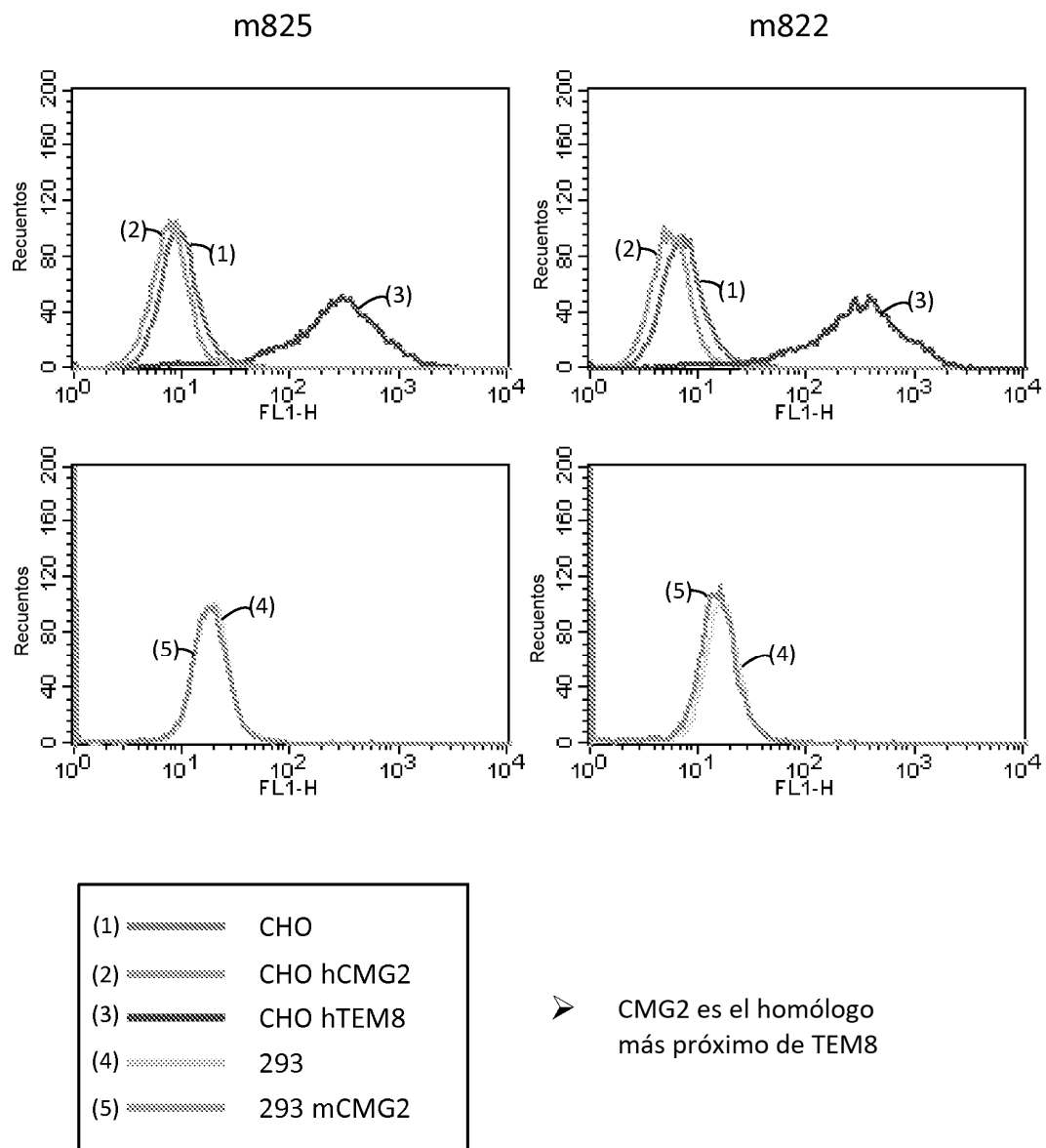


FIG. 1A

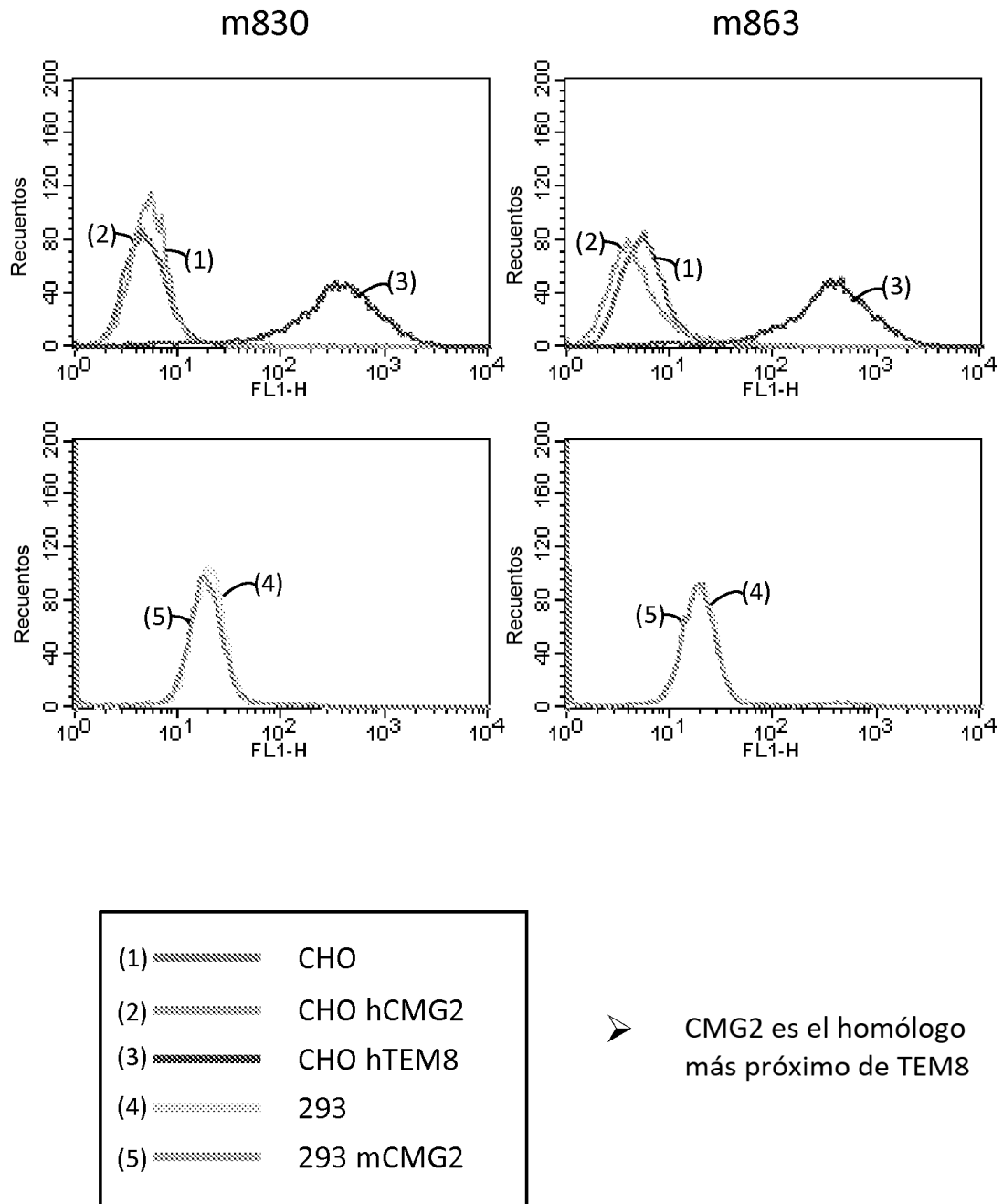


FIG. 1B

M825 tiñe vasos de tumor DLD-1 mediante inmunofluorescencia

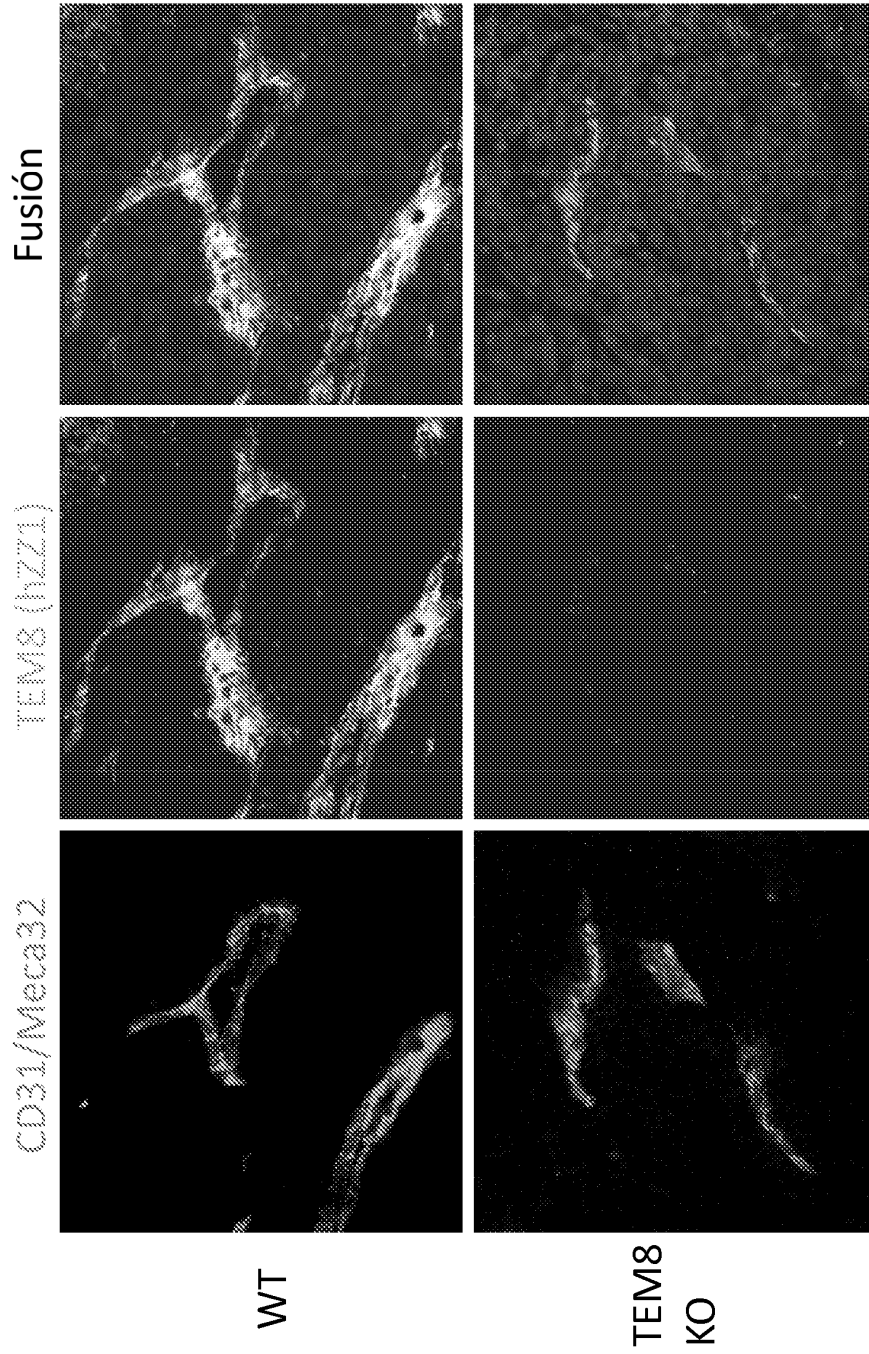


FIG. 2

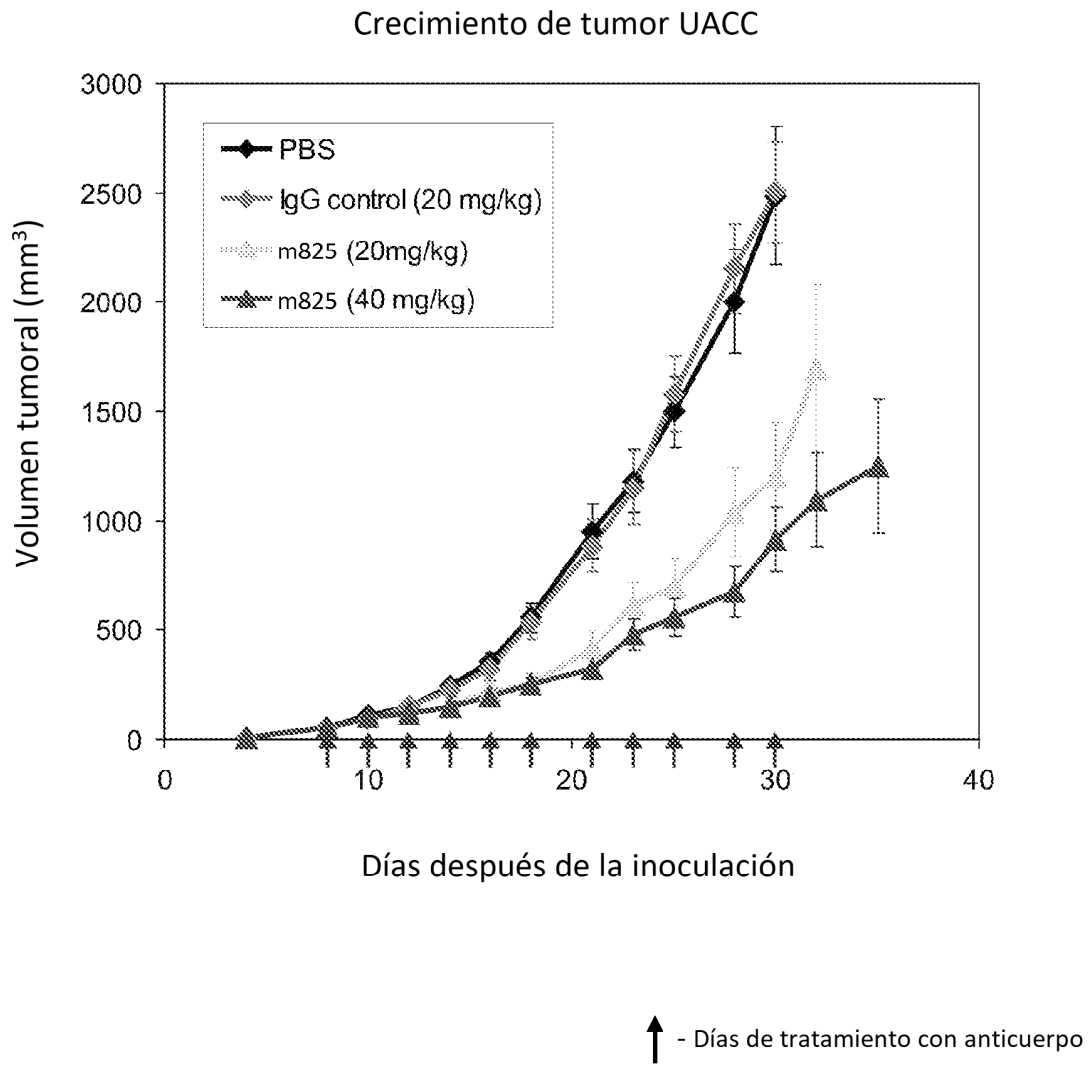


FIG. 3

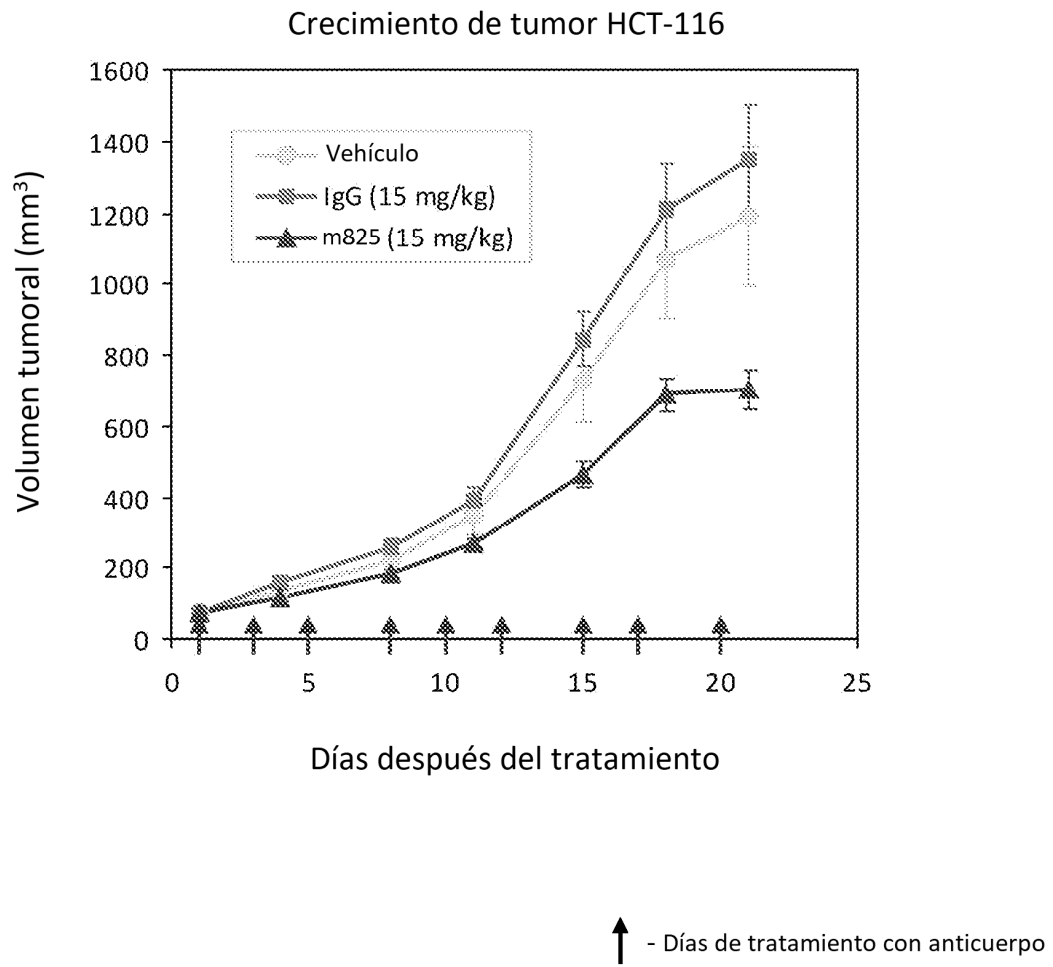


FIG. 4

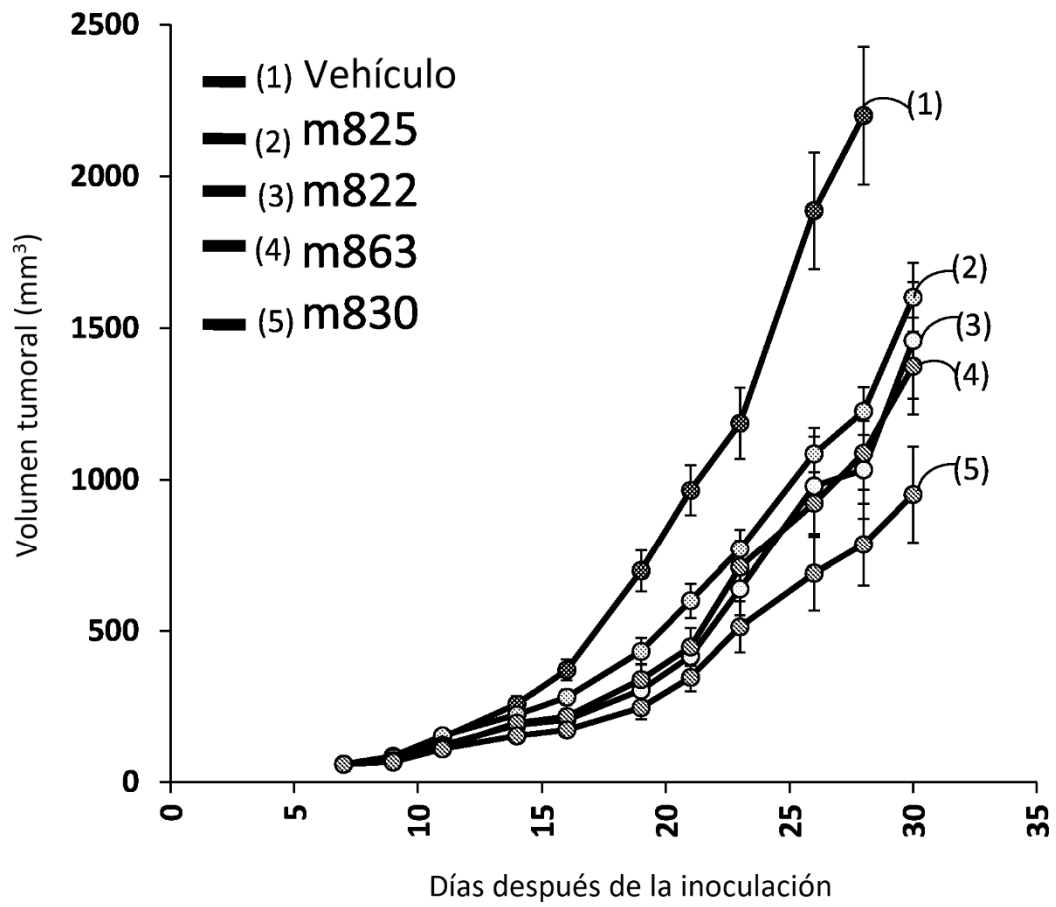


FIG. 5

FIG. 6A

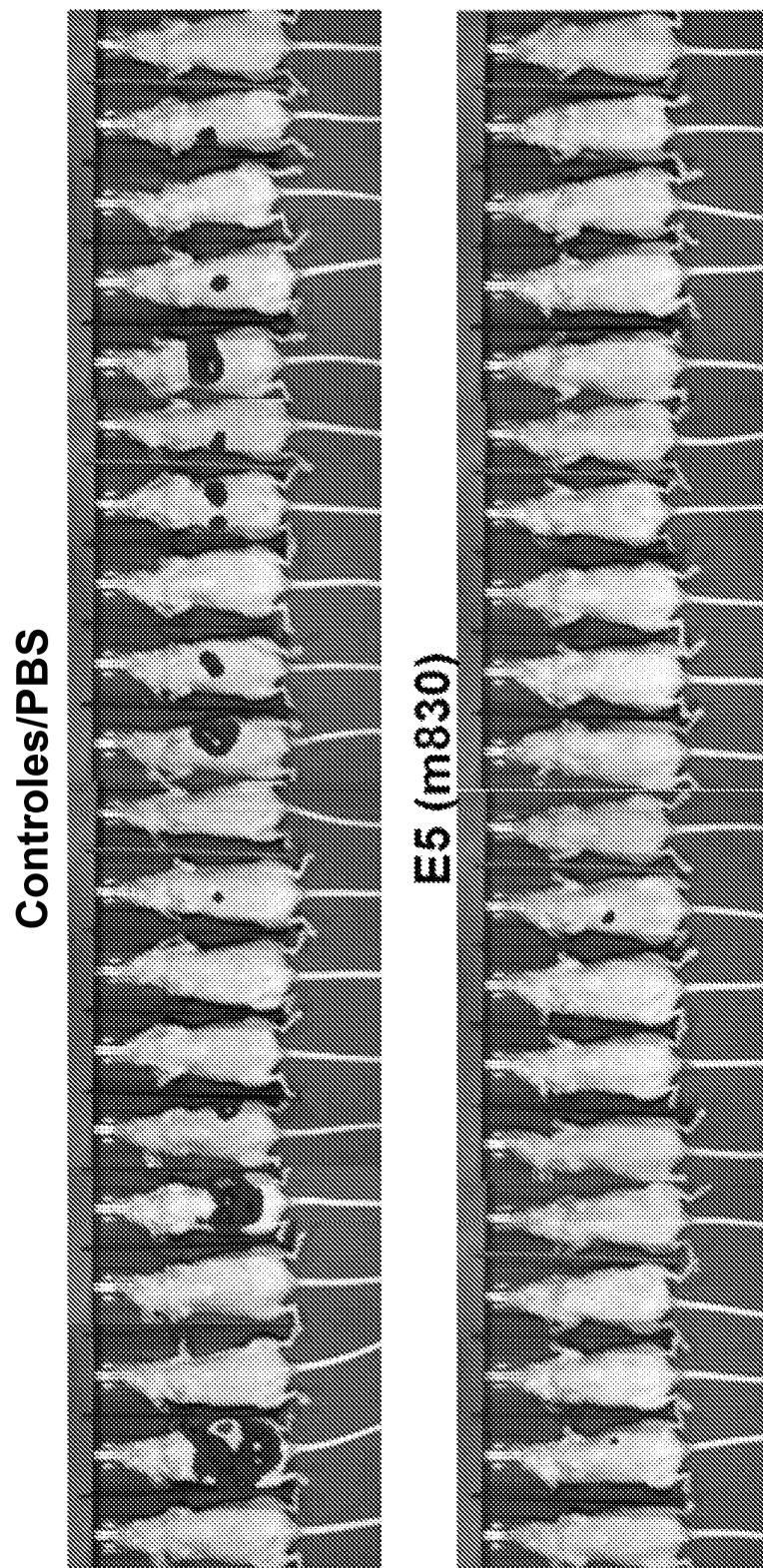


FIG. 6B

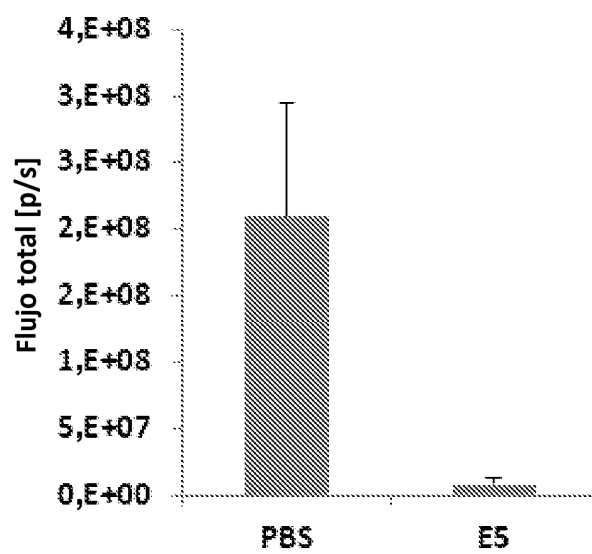
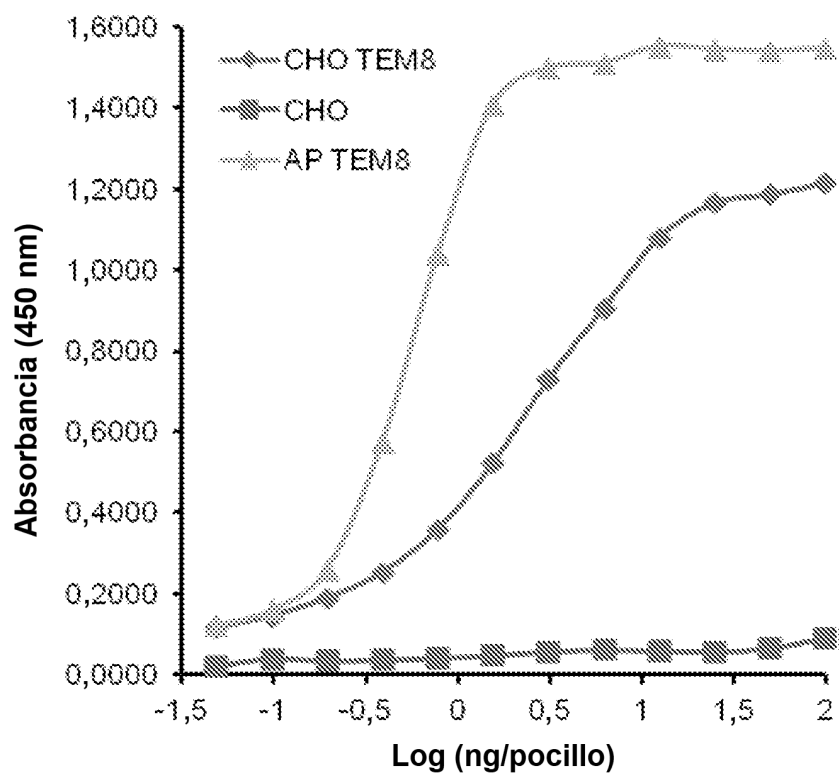


FIG. 7



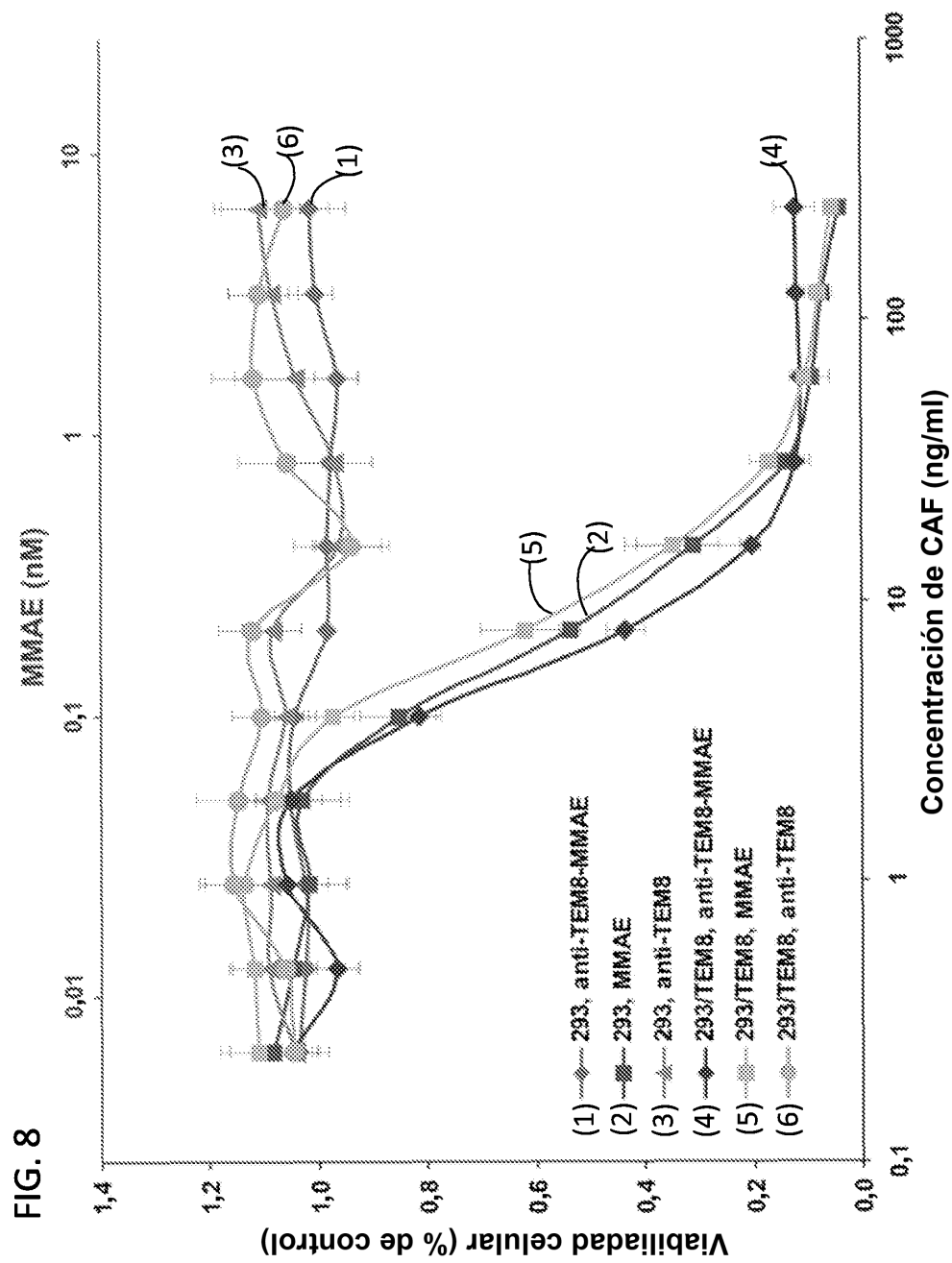


FIG. 9 Eficacia de CAF anti-TEM8 en modelo de colon HCT116

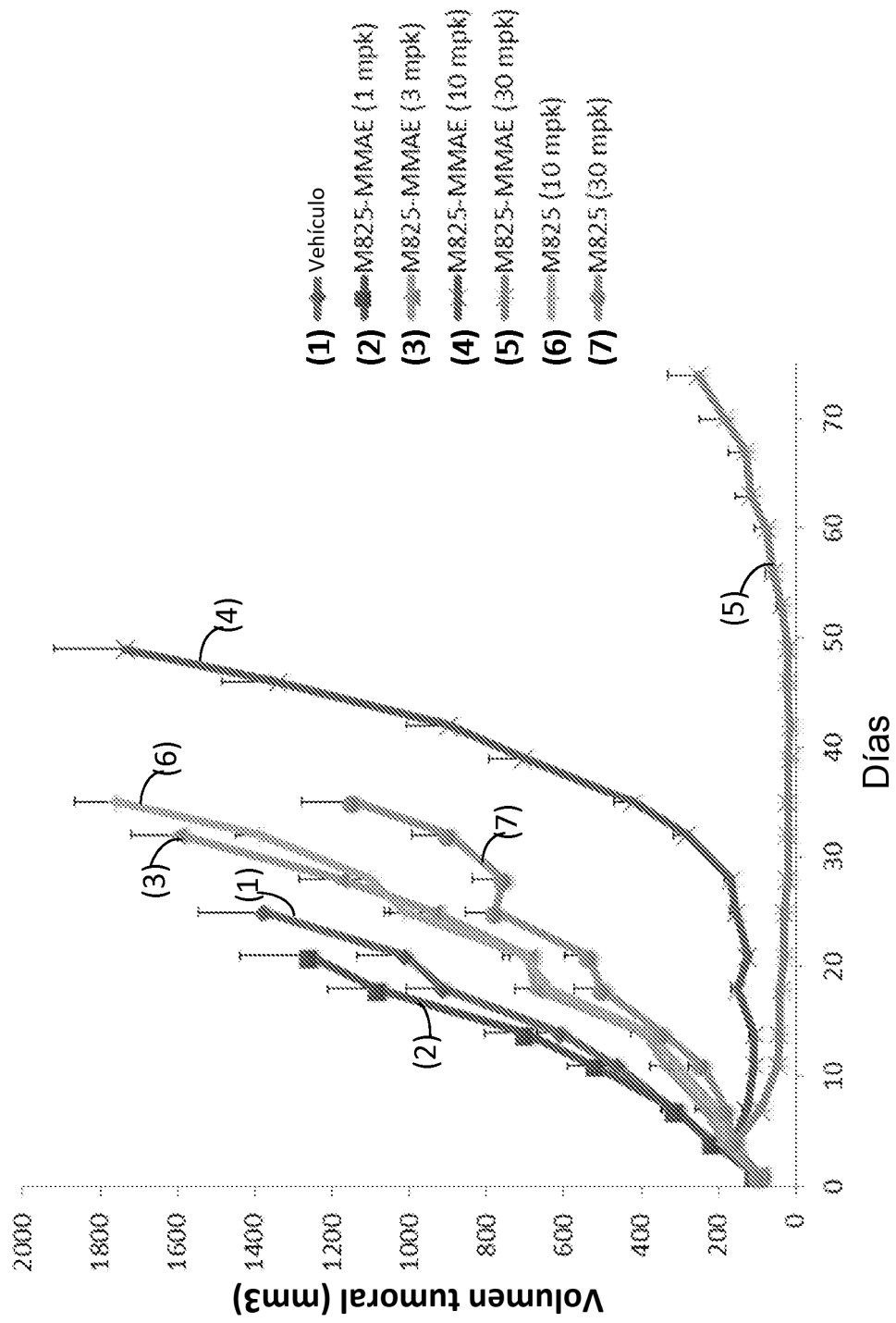


FIG. 10
Eficacia de CAF anti-TEM8 en modelo de ovario OVCA3

