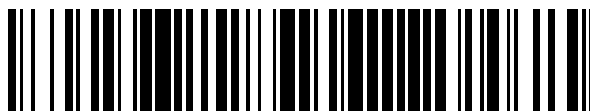


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 557**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2016 PCT/EP2016/071076**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.03.2017 WO17042210**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2016 E 16762800 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3347048**

54 Título: **Anticuerpos que tienen especificidad hacia nectina-4 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

09.09.2015 EP 15306370

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.11.2020

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (25.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITE D'AIX MARSEILLE (25.0%);
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%) y
INSTITUT JEAN PAOLI & IRÈNE CALMETTES (25.0%)**

72 Inventor/es:

**LOPEZ, MARC y
OLIVE, DANIEL**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 794 557 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 que tienen especificidad hacia nectina-4 y usos de los mismos

Campo de la invención:

La presente invención se refiere a anticuerpos que tienen especificidad hacia nectina-4 y a los usos de los mismos.

5 Antecedentes de la invención:

La nectina-4 es una molécula superficial que pertenece a la familia de proteínas nectinas, que comprende 4 miembros. Las nectinas son moléculas de adhesión celular que desempeñan un papel clave en diversos procesos biológicos, tales como la polaridad, proliferación, diferenciación y migración, para las células epiteliales, endoteliales, inmunitarias y neuronales, durante el desarrollo y la vida adulta. Están implicadas en varios procesos patológicos en los seres humanos. Son los receptores principales para los poliovirus, virus herpes simple y virus del sarampión. Las mutaciones en los genes que codifican Nectina-1 (*PVRL1*) o Nectina-4 (*PVRL4*) provocan síndromes de displasia ectodérmica asociados con otras anomalías. La nectina-4 se expresa durante el desarrollo fetal. En los tejidos adultos su expresión es más limitada que la de otros miembros de la familia. La nectina-4 es un antígeno asociado a tumores en un 50%, 49% y 86% de los carcinomas de mama, ovario y pulmón, respectivamente, principalmente en tumores con mal pronóstico. Su expresión no se detecta en los tejidos normales correspondientes. En los tumores de mama, se expresa Nectina-4 principalmente en los carcinomas triple negativos y ERBB2⁺. En el suero de pacientes con estos cánceres, la detección de las formas solubles de Nectina-4 está asociada con un mal pronóstico. Los niveles de Nectina-4 en suero se incrementan durante la progresión metastásica, y disminuyen después del tratamiento. Estos resultados sugieren que la Nectina-4 podría ser un objetivo fiable para el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, se han descrito varios anticuerpos anti-Nectina-4 en la técnica anterior. En particular, Enfortumab Vedotin (ASG-22ME) es un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC) que selecciona como objetivo la Nectina-4, y en la actualidad se investiga clínicamente para el tratamiento de pacientes que padecen tumores sólidos. Además, el documento titulado "A study of the safety and pharmacokinetics of AGS-22M6E in subjects with malignant solid tumors that express nectin-4" (www.clinicaltrials.gov/archive/NCT01409135/2015_06_22) describió el ensayo clínico de los anticuerpos anti-nectina-4 AGS-22M6E y ASG-22CE conjugados al agente citotóxico monometil auristatina E en sujetos con tumores sólidos malignos que expresaban nectina-4. La solicitud de patente WO2012/047724 también describió otro anticuerpo anti-nectina-4, Ha22-2.

Sumario de la invención:

La presente invención se refiere a anticuerpos que tienen especificidad hacia nectina-4 y a los usos de los mismos. En particular, la presente invención se define mediante las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención:

La presente invención describe anticuerpos que tienen especificidad hacia Nectina-4 y los usos de los mismos. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos que derivan del anticuerpo N41mab (N41mab). Los inventores muestran de hecho que el N41mab tuvo una actividad anti-metastásica intrínseca: N41mab redujo notablemente las propiedades invasivas tumorales de células tumorales de mama que expresaban nectina-4 reduciendo la invasión en Matrigel. Mediante el uso de modelos de ratones con xenoinjertos, se mostró que el tratamiento de los ratones con 10 mg/kg de N41mab dos veces a la semana conduce a una inhibición notable de la diseminación tumoral desde el sitio primario, y también a un bloqueo de la formación de metástasis tras la inyección sistémica de células tumorales en la vena de la cola de los ratones. La conjugación del N41mab con auristatina-E (N41mab-MMAE) indujo una inhibición notable del crecimiento de células tumorales de mama in vitro, con un valor de CI50 de 5 ng/ml (33 pM). Los ratones tratados al inicio del tumor con dos inyecciones i.v. de N41mab-MMAE a 2,5 o 10 mg/kg indujeron una regresión tumoral rápida y duradera. Más en particular, los inventores demuestran que el N41mab es más eficaz que el anticuerpo anti-nectina-4 más avanzado descrito en la técnica anterior (es decir, ASG-22ME). Por lo tanto, el anticuerpo representa una nueva forma de tratar a pacientes de cáncer para prevenir y/o erradicar la progresión tumoral.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "Nectina-4" tiene su significado general en la técnica, e incluye la Nectina-4 humana, en particular el polipéptido de secuencia nativa, las isoformas, los polipéptidos quiméricos, todos los homólogos, los fragmentos, y los precursores de la Nectina-4 humana. La secuencia de aminoácidos para la Nectina-4 nativa incluye la Secuencia de Referencia del NCBI: NP_112178.2.

Tal como se usan en la presente memoria, los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tienen el mismo significado, y se usarán por igual en la presente invención. El término "anticuerpo", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a las moléculas de inmunoglobulina y las porciones inmunológicamente activas de las moléculas de inmunoglobulina, es decir, las moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une de manera inmuno-específica a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo abarca no solamente las moléculas de anticuerpos completas, sino también los fragmentos de anticuerpos así como las variantes (que incluyen los derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo. En los anticuerpos naturales, dos cadenas pesadas están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro, y cada cadena pesada está unida a una cadena ligera mediante un enlace disulfuro.

Existen dos tipos de cadenas ligeras, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases principales de cadenas pesadas (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios de secuencia diferentes. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, denominados en conjunto CH). Las regiones variables de las cadenas ligeras (VL) y pesadas (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad de unión hacia el antígeno. Los dominios de la región constante de las cadenas ligeras (CL) y pesadas (CH) confieren propiedades biológicas importantes, tales como la asociación de las cadenas de anticuerpos, la secreción, la movilidad trans-placentaria, la unión al complemento, y la unión a receptores de Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fab de una inmunoglobulina, y consiste de las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad estructural entre el sitio de combinación del anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación del anticuerpo están constituidos por residuos que son principalmente de las regiones hipervariables o de determinación de la complementariedad (CDRs). Ocasionalmente, los residuos de las regiones no hipervariables o estructurales (FR) pueden participar en el sitio de unión del anticuerpo o influir en la estructura global del dominio, y por lo tanto en el sitio de combinación. Las regiones determinantes de la complementariedad o CDRs se refieren a las secuencias de aminoácidos que definen juntas la afinidad y especificidad de unión de la región Fv natural de un sitio de unión de la inmunoglobulina nativa. Las cadenas ligeras y pesadas de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDRs, denominadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente. Un sitio de unión al antígeno, por lo tanto, incluye en general seis CDRs, que comprenden el grupo de CDRs de cada región V de una cadena pesada y una ligera. Las regiones estructurales (FRs) se refieren a las secuencias de aminoácidos intercaladas entre las CDRs. Los residuos de los dominios variables de un anticuerpo se numeran de manera convencional según un sistema diseñado por Kabat et al. Este sistema se establece en Kabat et al., 1987, en *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud y Servicios Sociales de EE.UU., NIH, EE.UU. (a continuación, "Kabat et al."). En la presente memoria descriptiva se usa este sistema de numeración. Las designaciones de residuos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos de las secuencias de SEQ ID. La secuencia de aminoácidos lineal en cuestión puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales respecto de la numeración de Kabat estricta, que corresponde a un acortamiento o una inserción en un componente estructural, tanto en una región estructural como en una región determinante de la complementariedad (CDR), de la estructura básica del dominio variable. Se puede determinar la numeración de Kabat correcta de los residuos para un anticuerpo concreto mediante la alineación de los residuos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia "estándar" numerada según el sistema de Kabat. Las CDRs del dominio variable de la cadena pesada están localizadas en los residuos 31-35B (H-CDR1), los residuos 50-65 (H-CDR2) y los residuos 95-102 (H-CDR3) según el sistema de numeración de Kabat. Las CDRs del dominio variable de la cadena ligera están localizadas en los residuos 24-34 (L-CDR1), los residuos 50-56 (L-CDR2) y los residuos 89-97 (L-CDR3) según el sistema de numeración de Kabat.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "especificidad" se refiere a la capacidad de un anticuerpo de unirse de manera detectable a un epítipo presentado en un antígeno, tal como una Nectina-4, a la vez que tiene una reactividad detectable relativamente pequeña con proteínas o estructuras distintas de Nectina-4 (tales como otras proteínas presentadas en las células NK, o en otros tipos de células). La especificidad se puede determinar de manera relativa mediante ensayos de unión o de unión competitiva, mediante el uso, p.ej., de instrumentos Biacore, como se describe en otra parte en la presente memoria. La especificidad se puede exhibir, p.ej., mediante una proporción de alrededor de 10:1, alrededor de 20:1, alrededor de 50:1, alrededor de 100:1, 10,000:1 o mayor de afinidad/avidez en la unión al antígeno específico frente a la unión inespecífica a otras moléculas irrelevantes (en este caso el antígeno específico es un polipéptido de Nectina-4). El término "afinidad", tal como se usa en la presente memoria, significa la fuerza de la unión de un anticuerpo a un epítipo. La afinidad de un anticuerpo se proporciona mediante la constante de disociación K_d , definida como $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$, en donde $[Ab-Ag]$ es la concentración molar del complejo anticuerpo-antígeno, $[Ab]$ es la concentración molar del anticuerpo sin unir y $[Ag]$ es la concentración molar del antígeno sin unir. La constante de afinidad K_a se define mediante $1/K_d$. Los métodos preferidos para determinar la afinidad de los mAbs se pueden hallar en Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Coligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993), y Muller, *Meth. Enzymol.* 92:589-601 (1983), cuyas referencias se incorporan completamente en la presente memoria como referencia. Un método preferido y habitual muy conocido en la técnica para determinar la afinidad de los mAbs es el uso de instrumentos Biacore.

Según la presente invención, la región VH del N41mab consiste en la secuencia de SEQ ID N°:1. Por lo tanto, la H-CDR1 de N41mab se define mediante la secuencia abarcada desde el residuo de aminoácido de la posición 31 hasta el residuo de aminoácido de la posición 35 en SEQ ID N°:1. Por lo tanto, la H-CDR2 de N41mab se define mediante la secuencia abarcada desde el residuo de aminoácido de la posición 50 hasta el residuo de aminoácido de la posición 65 en SEQ ID N°:1. Por lo tanto, la H-CDR3 de N41mab se define mediante la secuencia abarcada desde el residuo de aminoácido de la posición 98 hasta el residuo de aminoácido de la posición 105 en SEQ ID N°:1.

60 SEQ ID N°:1: Región VH de N41mab FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGSTDYNA
FISRLSISKDTSKSVFFKMNSLQADDTAIYYCARELIHAMDNDWGQTSVTVSS

Según la presente invención, la región VL del anticuerpo N41mab consiste en la secuencia de SEQ ID N°:2. Por lo tanto, la L-CDR1 de N41mab se define mediante la secuencia abarcada desde el residuo de aminoácido de la posición 24 hasta el residuo de aminoácido de la posición 34 en SEQ ID N°:2. Por lo tanto, la L-CDR2 de N41mab se define mediante la secuencia abarcada desde el residuo de aminoácido de la posición 50 hasta el residuo de aminoácido de la posición 56 en SEQ ID N°:2. Por lo tanto, la L-CDR3 de N41mab se define mediante la secuencia abarcada desde el residuo de aminoácido de la posición 89 hasta el residuo de aminoácido de la posición 96 en SEQ ID N°:2.

SEQ ID N°:2: Región VL del anticuerpo N41mab FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQGNPQLLVFAATNLADGVPSRFS
GSQSGTQYSLKINSLSQSEDFGTYYCQHFHWGTPTFGGGTKLEIK

La presente invención proporciona por tanto anticuerpos que comprenden variantes funcionales de la región VL, la región VH, o una o más CDRs de N41mab. Una variante funcional de una VL, VH, o CDR usada en el contexto de un anticuerpo monoclonal de la presente invención todavía permite que el anticuerpo conserve al menos una proporción sustancial (al menos alrededor del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más) de la afinidad/avidez y/o la especificidad/selectividad del anticuerpo original (es decir, el anticuerpo N41mab), y en ciertos casos dicho anticuerpo monoclonal de la presente invención puede estar asociado con una mayor afinidad, selectividad y/o especificidad que el Ab original. Tales variantes funcionales conservan en general una identidad de secuencia significativa respecto del Ab original. La secuencia de las variantes de CDRs pueden diferir de la secuencia de las CDRs de las secuencias de los anticuerpos originales principalmente por medio de sustituciones conservativas; por ejemplo, al menos alrededor del 35%, alrededor del 50% o más, alrededor del 60% o más, alrededor del 70% o más, alrededor del 75% o más, alrededor del 80% o más, alrededor del 85% o más, alrededor del 90% o más, (p.ej., alrededor del 65-95%, tal como alrededor del 92%, 93% o 94%) de las sustituciones de la variante son sustituciones conservativas de residuos de aminoácidos. Las secuencias de las variantes de CDR pueden diferir de la secuencia de las CDRs de las secuencias de los anticuerpos originales principalmente por medio de sustituciones conservativas; por ejemplo, al menos 10, tal como al menos 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 de las sustituciones de la variante son sustituciones conservativas de residuos de aminoácidos. En el contexto de la presente invención, las sustituciones conservativas se pueden definir mediante las sustituciones en las clases de aminoácidos reflejadas a continuación:

Residuos alifáticos I, L, V, y M

Residuos asociados a cicloalqueno F, H, W, y Y

Residuos hidrófobos A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, y Y

Residuos cargados negativamente D y E

Residuos polares C, D, E, H, K, N, Q, R, S, y T

Residuos cargados positivamente H, K, y R

Residuos pequeños A, C, D, G, N, P, S, T, y V

Residuos muy pequeños A, G, y S

Residuos implicados en giros A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, y formación T

Residuos flexibles Q, T, K, S, G, P, D, E, y R

Los agrupamientos de sustituciones más conservativas incluyen: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina. La conservación desde el punto de vista de las propiedades hidropáticas/hidrófilas y el peso/tamaño de los residuos también se conserva sustancialmente en una CDR de una variante en comparación con una CDR de N41mab. En la técnica se entiende en general la importancia del índice hidropático de los aminoácidos en la concesión de una función biológica interactiva a una proteína. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, lo que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basándose en su hidrofobicidad y sus características de carga, que son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). La retención de residuos similares se puede medir también o de manera alternativa mediante una puntuación de similitud, tal como se determina mediante el uso de un programa BLAST (p.ej., BLAST 2.2.8 disponible del NCBI mediante el uso de los ajustes habituales BLOSUM62, Apertura de Hueco= 11 y Hueco

- 5 Prolongado= 1). Las variantes adecuadas exhiben en general al menos alrededor de un 70% de identidad respecto del péptido original. Según la presente invención, una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con una segunda secuencia de aminoácidos significa que la primera secuencia tiene 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80; 81; 82; 83; 84; 85; 86; 87; 88; 89; 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; o 100% de identidad con la segunda secuencia de aminoácidos. Según la presente invención, una primera secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 90% de identidad con una segunda secuencia de aminoácidos significa que la primera secuencia tiene 90; 91; 92; 93; 94; 95; 96; 97; 98; 99; o 100% de identidad con la segunda secuencia de aminoácidos.
- 10 En ciertas realizaciones, la presente invención describe un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende i) una H-CDR1 que tiene al menos un 90% de identidad con la H-CDR1 de N41mab, ii) una H-CDR2 que tiene al menos un 90% de identidad con la H-CDR2 de N41mab y iii) una H-CDR3 que tiene al menos un 90% de identidad con la H-CDR3 de N41mab.
- 15 En ciertas realizaciones, la presente invención describe un anticuerpo que tiene una cadena ligera que comprende i) una L-CDR1 que tiene al menos un 90% de identidad con la L-CDR1 de N41mab, ii) una L-CDR2 que tiene al menos un 90% de identidad con la L-CDR2 de N41mab y iii) una L-CDR3 que tiene al menos un 90% de identidad con la L-CDR3 de N41mab.
- 20 En ciertas realizaciones, la presente invención describe un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende i) una H-CDR1 que tiene al menos un 90% de identidad con la H-CDR1 de N41mab, ii) una H-CDR2 que tiene al menos un 90% de identidad con la H-CDR2 de N41mab y iii) una H-CDR3 que tiene al menos un 90% de identidad con la H-CDR3 de N41mab y una cadena ligera que comprende i) una L-CDR1 que tiene al menos un 90% de identidad con la L-CDR1 de N41mab, ii) una L-CDR2 que tiene al menos un 90% de identidad con la L-CDR2 de N41mab y iii) una L-CDR3 que tiene al menos un 90% de identidad con la L-CDR3 de N41mab.
- 25 En ciertas realizaciones, la presente invención describe un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende i) la H-CDR1 de N41mab, ii) la H-CDR2 de N41mab y iii) la H-CDR3 de N41mab.
- En ciertas realizaciones, la presente invención describe un anticuerpo que tiene una cadena ligera que comprende i) la L-CDR1 de N41mab, ii) la L-CDR2 de N41mab y iii) la L-CDR3 de N41mab.
- 30 En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que tiene una cadena pesada que comprende i) la H-CDR1 de N41mab, ii) la H-CDR2 de N41mab y iii) la H-CDR3 de N41mab, y una cadena ligera que comprende i) la L-CDR1 de N41mab, ii) la L-CDR2 de N41mab y iii) la L-CDR3 de N41mab.
- En ciertas realizaciones, la presente invención describe un anticuerpo que tiene una cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad con SEQ ID N°: 1
- 35 En ciertas realizaciones, la presente invención describe un anticuerpo que tiene una cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad con SEQ ID N°:2
- En ciertas realizaciones, la presente invención describe un anticuerpo que tiene una cadena pesada que tiene al menos un 70% de identidad con SEQ ID N°:1 y una cadena ligera que tiene al menos un 70% de identidad con SEQ ID N°:2.
- 40 En ciertas realizaciones, la presente invención describe un anticuerpo que tiene una cadena pesada que es idéntica a SEQ ID N°:1.
- En ciertas realizaciones, la presente invención describe un anticuerpo que tiene una cadena ligera que es idéntica a SEQ ID N°:2.
- 45 En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que tiene una cadena pesada idéntica a SEQ ID N°:1 y una cadena ligera idéntica a SEQ ID N°:2.
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo quimérico, en general un anticuerpo quimérico de ratón/humano. La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano, y un dominio CH y un dominio CL de un anticuerpo humano. Como animal no humano, se puede usar cualquier animal, tal como un ratón, rata, hámster, conejo o similares. En particular, dicho anticuerpo quimérico de ratón/humano puede comprender la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo N41mab.
- 50 En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humanizado que comprende las CDRs del anticuerpo N41mab. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a los anticuerpos en los que las regiones estructurales o las "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina donante de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina original.
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención se selecciona del grupo de Fab, F(ab')₂, Fab' y scFv. Tal como se usa en la presente memoria, el término "Fab" indica un fragmento de anticuerpo que tiene un peso

molecular de alrededor de 50.000 y actividad de unión al antígeno, en el que alrededor de la mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L completa, entre los fragmentos obtenidos tratando una IgG con una proteasa, papaína, están unidos entre sí por medio de un enlace disulfuro. El término "F(ab')₂" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de alrededor de 100.000 y actividad de unión al antígeno, que es ligeramente mayor que el Fab unido por medio de un enlace disulfuro de la región de la bisagra, entre los fragmentos obtenidos tratando una IgG con una proteasa, pepsina. El término "Fab" se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de alrededor de 50.000 y actividad de unión al antígeno, que se obtiene cortando un enlace disulfuro de la región de la bisagra del F(ab')₂. Un polipéptido Fv de cadena simple ("scFv") es un heterodímero VH::VL unido de manera covalente que se expresa normalmente a partir de una fusión de genes que incluyen los genes que codifican VH y VL unidos mediante un ligador que codifica un péptido. El fragmento de scFv humano de la invención incluye las CDRs que se mantienen en una conformación adecuada, preferiblemente usando técnicas de recombinación génica.

En otro aspecto, la invención describe un anticuerpo que compite por la unión a Nectina-4 con el anticuerpo de la invención.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "unión", en el contexto de la unión de un anticuerpo a un antígeno o epítipo predeterminado, es en general una unión con una afinidad que corresponde a una K_D de alrededor de 10⁻⁷ M o menos, tal como alrededor de 10⁻⁸ M o menos, tal como alrededor de 10⁻⁹ M o menos, alrededor de 10⁻¹⁰ M o menos, o alrededor de 10⁻¹¹ M o incluso menos cuando se determina, por ejemplo, mediante la tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 mediante el uso de una forma soluble del antígeno como ligando y el anticuerpo como analito. BIACORE® (GE Healthcare, Piscataway, NJ) es una de una diversidad de formatos de ensayo de resonancia de plasmones superficiales que se usan de manera rutinaria para analizar paneles de unión a epítopos de anticuerpos monoclonales. En general, un anticuerpo se une al antígeno predeterminado con una afinidad que corresponde a una K_D que es al menos diez veces inferior, tal como al menos 100 veces inferior, por ejemplo al menos 1.000 veces inferior, tal como al menos 10.000 veces inferior, por ejemplo al menos 100.000 veces inferior a su K_D para la unión a un antígeno inespecífico (p.ej., BSA, caseína), que no es idéntico o estrechamente relacionado con el antígeno predeterminado. Cuando la K_D del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo tiene una afinidad elevada), la K_D con la que se une al antígeno es en general al menos 10.000 veces inferior a su K_D para un antígeno inespecífico. Se dice que un anticuerpo básicamente no se une a un antígeno o epítipo si tal unión es indetectable (mediante el uso, por ejemplo, de la tecnología de resonancia de plasmones (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 mediante el uso de una forma soluble del antígeno como ligando y el anticuerpo como analito), o es 100 veces, 500 veces, 1000 veces o más de 1000 veces menor que la unión detectada mediante ese anticuerpo y un antígeno o epítipo que tiene una estructura química o secuencia de aminoácidos diferente.

Se pueden identificar anticuerpos adicionales basándose en su capacidad de competir de manera cruzada (p.ej., inhibir competitivamente la unión, de una manera estadísticamente significativa) con otros anticuerpos de la invención en ensayos estándar de unión a Nectina-4. La capacidad de un anticuerpo de ensayo de inhibir la unión de los anticuerpos de la presente invención a Nectina-4 demuestra que el anticuerpo de ensayo puede competir con ese anticuerpo por la unión a Nectina-4, y tal anticuerpo puede, según una teoría no limitante, unirse al mismo epítipo o a un epítipo relacionado (p.ej., uno estructuralmente similar o próximo espacialmente) en la Nectina-4 como el anticuerpo con el que compite. Por tanto, otro aspecto de la invención proporciona anticuerpos que se unen al mismo antígeno que, y que compiten con, los anticuerpos descritos en la presente memoria. Tal como se usa en la presente memoria, un anticuerpo "compite" por la unión cuando el anticuerpo competidor inhibe la unión a Nectina-4 de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de la invención en más de un 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% en presencia de una concentración equimolar de anticuerpo competidor.

En otras realizaciones, la invención describe anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de la invención que se unen a uno o más epítopos de Nectina-4. En ciertas realizaciones, los epítopos a los que se unen los presentes anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son epítopos lineales. En otras realizaciones, los epítopos a los que se unen los presentes anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno son epítopos conformacionales no lineales.

Los anticuerpos de la invención se pueden ensayar por la unión específica mediante cualquier método conocido en la técnica. Se puede(n) usar mucho(s) formato(s) diferente(s) de ensayo de unión competitiva para la unión al epítipo. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, pero sin limitación, los sistemas de ensayos competitivos mediante el uso de técnicas tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA, inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos con precipitina, ensayos con precipitina de difusión en gel, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, y ensayos de fijación del complemento. Tales ensayos son rutinarios y se conocen bien en la técnica (véase, p.ej., Ausubel et al., eds, 1994 Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & sons, Inc., Nueva York).

Los anticuerpos de la presente invención se producen mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como, sin limitación, cualquier técnica química, biológica, genética o enzimática, sola o en combinación. En general, conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la técnica puede producir fácilmente dichos anticuerpos, mediante técnicas habituales para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, se pueden sintetizar mediante el uso de un método en fase sólida muy conocido, preferiblemente mediante el uso de un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (tal como el producido por Applied Biosystems, Foster City, California) y

siguiendo las instrucciones del fabricante. De manera alternativa, los anticuerpos de la presente invención se pueden sintetizar mediante técnicas de ADN recombinante muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden obtener en forma de productos de expresión de ADN tras la incorporación de secuencias de ADN que codifican los anticuerpos en vectores de expresión, y la introducción de tales vectores en hospedadores eucarióticos o procarióticos adecuados que expresarán los anticuerpos deseados, a partir de lo cual se pueden aislar más tarde mediante el uso de técnicas muy conocidas.

Por lo tanto, un objetivo adicional de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo según la invención. Más en particular, la molécula de ácido nucleico codifica una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo de la presente invención. Más en particular, la presente invención describe una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene un 70% de identidad con SEQ ID N°:3 o SEQ ID N°:4.

SEQ ID N°:3 Cadena pesada: Secuencia de ADN FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCAGGACCTGGCCTAGTGCAGCCCTCACAGAGCCTGTCCATC
 ACCTGCACAGTCTCTGGTTTCTCACTTACTAACTATGGTGTACTGGGTTCGCCAGTCTCCAGGA
 AAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTGATATGGAGTGGTGGTAGCACAGACTATAATGCAGCTTTC
ATATCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTTAAAATGAACAGTCTG
 CAAGCTGATGACACAGCCATATACTACTGTGCCAGAGAGTTAAATCCATGCTATGGACAACTGGG
 GCCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID N°:4 Cadena ligera: Secuencia de ADN FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTATCTGTGGGAGAACTGTCACCA
 TCACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTAATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAA
 CTCTCCTCAGCTCCTGGTCTTTGCTGCAACAACTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTTCAGTGG
 CAGTGGATCAGGCACACAGTATTCCTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGGGACTTA
 TTACTGTCAACATTTTGGGGTACTCCGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA

En general, dicho ácido nucleico es una molécula de ADN o ARN, que se puede incluir en cualquier vector adecuado, tal como un plásmido, cósmido, episoma, cromosoma artificial, fago o un vector viral. Tal como se usan en la presente memoria, los términos "vector", "vector de clonación" y "vector de expresión" significan el vehículo mediante el cual se puede introducir una secuencia de ADN o ARN (p.ej. un gen exógeno) en una célula hospedadora, para transformar al hospedador y estimular la expresión (p.ej. la transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Por tanto, un objetivo adicional de la invención se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico de la invención. Tales vectores pueden comprender elementos reguladores, tales como un promotor, potenciador, terminador y similares, para provocar o dirigir la expresión de dicho anticuerpo tras la administración a un sujeto. Los ejemplos de promotores y potenciadores usados en el vector de expresión para células animales incluyen el promotor temprano y el potenciador de SV40, el promotor y potenciador de LTR del virus de la leucemia murina de Moloney, el promotor y potenciador de la cadena H de inmunoglobulina, y similares. Se puede usar el vector de expresión ny para células animales, con tal de que se pueda insertar y expresar un gen que codifica la región C de un anticuerpo humano. Los ejemplos de vectores adecuados incluyen pAGE107, pAGE103, pHSG274, pKCR, pSG1 beta d2-4 y similares. Otros ejemplos de plásmidos incluyen plásmidos de replicación que comprenden un origen de replicación, o plásmidos integrativos, tales como, por ejemplo, pUC, pcDNA, pBR, y similares. Otros ejemplos de vectores virales incluyen los vectores adenovirales, retrovirales, de herpesvirus y AAV. Tales virus recombinantes se pueden producir mediante métodos conocidos en la técnica, tales como transfectando células de empaquetamiento o mediante la transfección transitoria con virus o plásmidos auxiliares. Los ejemplos típicos de células de empaquetamiento de virus incluyen células PA317, células PsiCRIP, células GPenV+, células 293, etc. Los protocolos detallados para la producción de tales virus recombinantes deficientes de replicación se pueden hallar, por ejemplo, en los documentos WO 95/14785, WO 96/22378, US 5.882.877, US 6.013.516, US 4.861.719, US 5.278.056 y WO 94/19478.

Un objetivo adicional de la presente invención se refiere a una célula hospedadora que se ha transfectado, infectado o transformado mediante un ácido nucleico y/o un vector según la invención. Tal como se usa en la presente memoria, el término "transformación" significa la introducción de un gen, secuencia de ADN o ARN "exógeno" (es decir, extrínseco o extracelular) en una célula hospedadora, de forma que la célula hospedadora expresa el gen o la secuencia introducida para producir una sustancia deseada, en general una proteína o enzima codificada por el gen o la secuencia introducida. Una célula hospedadora que recibe y expresa el ADN o ARN introducido ha sido "transformada".

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar para producir un anticuerpo de la presente invención en un

sistema de expresión adecuado. La expresión "sistema de expresión" significa una célula hospedadora y un vector compatible en condiciones adecuadas, p.ej. para la expresión de una proteína codificada por un ADN exógeno portado por el vector e introducido en la célula hospedadora. Los sistemas de expresión habituales incluyen células hospedadoras y vectores plasmídicos de *E. coli*, células hospedadoras de insecto y vectores de Baculovirus, y células hospedadoras y vectores de mamífero. Otros ejemplos de células hospedadoras incluyen, sin limitación, células procarióticas (tales como bacterias) y células eucarióticas (tales como células de levadura, células de mamífero, células de insecto, células vegetales, etc.). Los ejemplos específicos incluyen *E. coli*, levaduras *Kluyveromyces* o *Saccharomyces*, líneas celulares de mamífero (p.ej., células Vero, células CHO, células 3T3, células COS, etc.) así como cultivos celulares de mamífero primarios o establecidos (p.ej., producidos a partir de linfoblastos, fibroblastos, células embrionarias, células epiteliales, células nerviosas, adipocitos, etc.). Los ejemplos también incluyen células SP2/0-Ag14 de ratón (ATCC CRL1581), células P3X63-Ag8.653 de ratón (ATCC CRL1580), células CHO en las que un gen de dihidrofolato reductasa (denominado más adelante en la presente memoria "gen DHFR") está defectuoso (Urlaub G et al; 1980), células YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 de rata (ATCC CRL1662, denominadas más adelante en la presente memoria "células YB2/0"), y similares. La presente invención también se refiere a un método para producir una célula hospedadora recombinante que expresa un anticuerpo según la invención, y dicho método comprende las etapas de: (i) introducir in vitro o ex vivo un ácido nucleico recombinante o un vector como se describió anteriormente en una célula hospedadora competente, (ii) cultivar in vitro o ex vivo la célula hospedadora recombinante obtenida y (iii), opcionalmente, seleccionar las células que expresan y/o secretan dicho anticuerpo. Tales células hospedadoras recombinantes se pueden usar para la producción de los anticuerpos de la presente invención.

Los anticuerpos de la presente invención se separan de manera adecuada del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía con hidroxipatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo quimérico humano de la presente invención se puede producir obteniendo las secuencias nucleicas que codifican los dominios VL y VH como se describió previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpos quiméricos humanos insertándolas en un vector de expresión para células animales que tienen genes que codifican el dominio CH del anticuerpo humano y el dominio CL del anticuerpo humano, y expresando la secuencia codificante introduciendo el vector de expresión en una célula animal. Como dominio CH de un anticuerpo quimérico humano, pueden ser cualquier región que pertenezca a una inmunoglobulina humana, pero las de la clase IgG son adecuadas, y también se puede usar cualquiera de las subclases que pertenecen a la clase IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. También, como dominio CL de un anticuerpo quimérico humano, puede ser cualquier región que pertenezca a Ig, y se pueden usar las de la clase kappa o la clase lambda. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican las técnicas convencionales de transfección de genes y ADN recombinante, que se conocen bien en la técnica (véase Morrison SL. et al. (1984) y los documentos de patente US 5.202.238; y US 5.204.244).

El anticuerpo humanizado de la presente invención se puede producir obteniendo las secuencias de ácido nucleico que codifican los dominios de CDRs, como se describió previamente, construyendo un vector de expresión de anticuerpos humanizados insertándolas en un vector de expresión para células animales que tiene genes que codifican (i) una región constante de la cadena pesada idéntica a la de un anticuerpo humano y (ii) una región constante de la cadena ligera idéntica a la de un anticuerpo humano, y expresando los genes introduciendo el vector de expresión en una célula animal. El vector de expresión del anticuerpo humanizado puede ser de un tipo en el que un gen que codifica una cadena pesada del anticuerpo y un gen que codifica una cadena ligera del anticuerpo existen en vectores diferentes, o de un tipo en el que ambos genes existen en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector de expresión de anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en las células animales, y el equilibrio entre los niveles de expresión de las cadenas H y L del anticuerpo en las células animales, se prefiere el vector de expresión de anticuerpo humanizado de tipo tándem. Los ejemplos de vector de expresión de anticuerpo humanizado de tipo tándem incluyen pKANTEX93 (documento WO 97/10354), pEE18 y similares. Los métodos para producir anticuerpos humanizados basándose en el ADN recombinante convencional y las técnicas de transfección génica son muy conocidos en la técnica (véase, p.ej., Riechmann L. et al. 1988; Neuberger MS. et al. 1985). Los anticuerpos se pueden humanizar mediante el uso de una diversidad de métodos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, el injerto de CDR (documento EP 239.400; publicación PCT WO91/09967; pat. de EE.UU. n°s 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), revestimiento o modificación de la superficie (documentos EP 592.106; EP 519.596; Padlan EA (1991); Studnicka GM et al. (1994); Roguska MA. et al. (1994)), y reordenamiento aleatorio de cadenas (pat. de EE.UU. n° 5.565.332). También se conoce la tecnología general de ADN recombinante para la preparación de tales anticuerpos (véase la solicitud de patente europea EP 125023 y la solicitud de patente internacional WO 96/02576).

El Fab de la presente invención se puede obtener tratando un anticuerpo que reacciona de manera específica con AMH con una proteasa, papaína. Además, el Fab se puede producir insertando un ADN que codifica el Fab del anticuerpo en un vector para un sistema de expresión procariótico, o para un sistema de expresión eucariótico, e introduciendo el vector en un procarionte o eucariote (según sea adecuado) para expresar el Fab.

El F(ab')₂ de la presente invención se puede obtener tratando un anticuerpo que reacciona de manera específica con AMH con una proteasa, pepsina. Además, el F(ab')₂ se puede producir uniendo el Fab' descrito más adelante por medio de un enlace tioéter o un enlace disulfuro.

El Fab' de la presente invención se puede obtener tratando un F(ab')₂ que reacciona de manera específica con AMH con un agente reductor, ditiotreitól. Además, el Fab' se puede producir insertando un ADN que codifica el fragmento de Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procariontes, o un vector de expresión para eucariotes, e introduciendo el vector en un procarionte o eucariota (según sea adecuado) para llevar a cabo su expresión.

5 El scFv de la presente invención se puede producir obteniendo un cADN que codifica los dominios VH y VL como se describió previamente, construyendo un ADN que codifica el scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariontes, o un vector de expresión para eucariotes, y después introduciendo el vector de expresión en un procarionte o eucariota (según sea adecuado) para expresar el scFv. Para generar un fragmento de scFv humanizado, se puede
10 usar una tecnología muy conocida denominada injerto de CDRs, que implica seleccionar las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) a partir de un fragmento scFv donante, e injertarlas en una región estructural de un fragmento scFv humano de estructura tridimensional conocida (véanse, p.ej., los documentos WO98/45322; WO 87/02671; US5.859.205; US5.585.089; US4.816.567; EP0173494).

Los anticuerpos modificados de la presente invención incluyen aquellos en los que se han hecho modificaciones en residuos estructurales de VH y/o VL, p.ej. para mejorar las propiedades del anticuerpo. En general, se hacen tales
15 modificaciones estructurales para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, una aproximación es "retromutar" uno o más residuos estructurales hasta la secuencia de la línea germinal correspondiente. De manera más específica, un anticuerpo que se ha sometido a una mutación somática puede contener residuos estructurales que difieren de la secuencia de la línea germinal a partir de la que deriva el anticuerpo. Tales residuos se pueden identificar comparando las secuencias estructurales del anticuerpo respecto de las secuencias de la línea germinal de
20 la que deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de las regiones estructurales a su configuración de la línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden "retromutar" hasta la secuencia de la línea germinal, por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida o mutagénesis mediada por PCR. También se pretende que tales anticuerpos "retromutados" estén abarcados por la invención. Otro tipo de modificación estructural implica mutar uno o más residuos de la región estructural, o incluso en una o más regiones de CDRs, para eliminar epítomos de células T para
25 reducir de ese modo la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Esta aproximación también se denomina "desinmunización", y se describe con más detalle en la publicación de patente de EE.UU. n.º 20030153043, de Carr et al.

El anticuerpo de la invención se puede caracterizar mediante una o más de las características funcionales o
30 estructurales de los aspectos descritos anteriormente, o mediante cualquier combinación de características funcionales y estructurales seleccionadas.

El anticuerpo de la invención puede ser de cualquier isotipo. La elección del isotipo en general se guiará por las funciones efectoras deseadas, tales como la inducción de ADCC. Los isotipos ejemplares son IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. Se puede usar cualquiera de las regiones constantes de la cadena ligera humana, kappa o lambda. Si se desea, la clase de un anticuerpo de la presente invención se puede cambiar mediante métodos conocidos. En general, se
35 pueden usar técnicas de cambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo de IgG1 a IgG2. Por tanto, la función efectora de los anticuerpos de la presente invención se puede cambiar mediante el cambio de isotipo hasta, p.ej., un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, o IgM para los diversos usos terapéuticos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo de longitud completa. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de longitud completa es un anticuerpo IgG1. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de longitud completa es un anticuerpo IgG4. En ciertas realizaciones, el anticuerpo IgG4 específico de Nectina-4 es un anticuerpo IgG4 estabilizado. Los ejemplos de anticuerpos IgG4 estabilizados adecuados son los anticuerpos en los que la arginina de la posición 409 de una región constante de la cadena pesada de IgG4 humana, que se indica en el índice EU como en Kabat et al. anteriormente mencionado, está sustituida con lisina, treonina, metionina, o leucina, preferiblemente lisina (descrito en el documento WO2006033386), y/o en los que la región de la bisagra comprende una secuencia
40 Cys-Pro-Pro-Cys. Se describen otros anticuerpos IgG4 estabilizados adecuados en el documento WO2008145142. En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de un tipo distinto de IgG4, p.ej. IgG1, IgG2 o IgG3 que se ha mutado de forma que la capacidad de mediar en las funciones efectoras, tales como ADCC, se ha reducido o incluso se ha eliminado. Tales mutaciones se han descrito, p.ej., en Dall'Acqua WF et al., J Immunol. 177(2) : 1129-1138 (2006) y Hezareh M, J Virol. 75(24) : 12161-12168 (2001).

Además o de manera alternativa a las modificaciones hechas en las regiones estructurales o en las CDRs, los anticuerpos de la presente invención se pueden modificar para incluir modificaciones en la región Fc, en general para
50 alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación al complemento, la unión a un receptor de Fc, y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígenos. Además, un anticuerpo de la presente invención se puede modificar químicamente (p.ej., se pueden unir uno o más restos químicos al anticuerpo), o se puede modificar para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Por ejemplo, se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente invención se puede alterar mediante el uso de cualquier método adecuado conocido en la técnica. La presente invención también se refiere por tanto a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada hacia Nectina-4. Tales variantes se pueden obtener mediante varios protocolos de maduración de afinidad, que incluyen mutar las CDRs (Yang et al., J. Mol. Biol., 254, 392-403, 1995), reordenamiento aleatorio de cadenas (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), el uso de cepas mutadoras de E. coli (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), reordenamiento aleatorio de ADN (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), expresión
60

en fagos (Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) y PCR sexual (Cramer et al., *Nature*, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (anteriormente mencionado) discute estos métodos de maduración de afinidad.

5 En ciertas realizaciones, la región de la bisagra de CH1 se modifica de forma que se altera el número de residuos de cisteína en la región de la bisagra, p.ej., se incrementa o disminuye. Esta aproximación se describe adicionalmente en la patente de EE.UU. nº 5.677.425 de Bodmer et al. El número de residuos de cisteína en la región de la bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para incrementar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

10 En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención se modifica para incrementar su semivida biológica. Son posibles diversas aproximaciones. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describe en la patente de EE.UU. nº 6.277.375 de Ward. De manera alternativa, para incrementar la semivida biológica, el anticuerpo se puede alterar en la región CH1 o CL para que contenga un epítipo de unión a receptor natural tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de EE.UU. nºs 5.869.046 y 6.121.022 de Presta et al.

15 En ciertas realizaciones, la región Fc se altera sustituyendo al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden sustituir uno o más aminoácidos con un residuo de aminoácido diferente de forma que el anticuerpo tenga una afinidad alterada hacia un ligando efector, pero conserve la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo original. El ligando efector hacia el que la afinidad está alterada puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Esta aproximación se describe con más detalle en las patentes de EE.UU. nºs 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter et al.

20 En ciertas realizaciones, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos se pueden sustituir con un residuo de aminoácido diferente de forma que el anticuerpo tenga una unión alterada a C1q y/o una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o anulada. Esta aproximación se describe con más detalle en la patente de EE.UU. nº 6.194.551.

25 En ciertas realizaciones, se alteran uno o más residuos de aminoácidos para alterar de ese modo la capacidad del anticuerpo de fijarse al complemento. Esta aproximación se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer et al. En otra realización, la región Fc se modifica para incrementar la capacidad del anticuerpo de mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), y/o para incrementar la afinidad del anticuerpo hacia un receptor de Fc modificando uno o más aminoácidos. Esta aproximación se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn se han cartografiado y se han descrito variantes con una unión mejorada (véase Shields, R. L. et al, 2001 *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604, documento WO2010106180).

35 En ciertas realizaciones, se modifica la glicosilación del anticuerpo. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar, por ejemplo, para incrementar la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden llevar a cabo, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos, que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación en las regiones estructurales de la región variable, para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación puede incrementar la afinidad del anticuerpo hacia el antígeno. Tal aproximación se describe con más detalle en las patentes de EE.UU. nºs 5.714.350 y 6.350.861 de Co et al. Además o de manera alternativa, se puede producir un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado o sin fucosilar que tenga cantidades reducidas o inexistentes de residuos fucosilo, o un anticuerpo que tenga estructuras GlcNac bisecantes incrementadas. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados incrementan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden llevar a cabo, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con una maquinaria de glicosilación alterada. Las células con una maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica, y se pueden usar como células hospedadoras en las que expresar los anticuerpos recombinantes de la presente invención para producir de ese modo un anticuerpo con una glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hang et al. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosiltransferasa, de forma que los anticuerpos expresados en tal línea celular exhiben una hipofucosilación, o están desprovistos de residuos fucosilo. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se pueden producir mediante expresión recombinante en una línea celular que exhibe un patrón de hipofucosilación o sin fucosilación, por ejemplo, una línea celular de mamífero con una expresión deficiente del gen FUT8 que codifica la fucosiltransferasa. La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una línea de células CHO variantes, células Lecl3, con una capacidad reducida de unir fucosa a carbohidratos unidos a Asn(297), que también da como resultado la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R.L. et al, 2002 *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). La publicación PCT WO 99/54342 de Umana et al. describe líneas celulares modificadas para expresar glicosiltransferasas que modifican glicoproteínas (p.ej., beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de forma que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas exhiben estructuras de GlcNac bisecantes incrementadas que dan como resultado una actividad de ADCC incrementada de los anticuerpos (véase también Umana et al, 1999 *Nat. Biotech.* 17: 176-180). Eureka Therapeutics describe además células mamíferas CHO modificadas genéticamente

capaces de producir anticuerpos con un patrón alterado de glicosilación de mamífero desprovisto de residuos fucosilo (<http://www.eurekainc.com/a&boutus/companyoverview.html>). De manera alternativa, los anticuerpos de la presente invención se pueden producir en levaduras u hongos filamentosos modificados para tener un patrón de glicosilación similar al de los mamíferos y capaces de producir anticuerpos que carecen de fucosa como patrón de glicosilación (véase, por ejemplo, el documento EP1297172B1).

Otra modificación de los anticuerpos de la presente memoria que se contempla en la invención es la pegilación. Un anticuerpo se puede pegilar, por ejemplo, para incrementar la semivida biológica (p.ej., en suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o un fragmento del mismo, se hace reaccionar en general con polietilén glicol (PEG), tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG, en condiciones en las que uno o más grupos de PEG se unen al anticuerpo o al fragmento de anticuerpo. La pegilación se puede llevar a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula reactiva de PEG (o un polímero hidrosoluble reactivo análogo). Tal como se usa en la presente memoria, el término "polietilén glicol" pretende abarcar cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como mono-alcoxi (C1-C10)- o ariloxi-poli etilén glicol o polietilén glicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a pegilar es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegilar proteínas se conocen en la técnica, y se pueden aplicar a los anticuerpos de la presente invención. Véase, por ejemplo, el documento EP 0 154 316 de Nishimura et al., y el documento EP 0 401 384 de Ishikawa et al.

Otra modificación de los anticuerpos que se contempla en la invención es un conjugado o una fusión de proteínas de al menos la región de unión al antígeno del anticuerpo de la presente invención a una proteína sérica, tal como la albúmina de suero humano o un fragmento de la misma para incrementar la semivida de la molécula resultante. Tal aproximación se describe, por ejemplo, en Ballance et al., documento EP0322094.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un anticuerpo multiespecífico que comprende un primer sitio de unión al antígeno de un anticuerpo de la molécula de la presente invención descrita anteriormente en la presente memoria, y al menos un segundo sitio de unión al antígeno. En ciertas realizaciones, el segundo sitio de unión al antígeno se usa para reclutar un mecanismo de destrucción tal como, por ejemplo, uniéndose a un antígeno en una célula efectora humana o uniéndose a un agente citotóxico o a un segundo agente terapéutico. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, al contrario que las fases cognitivas y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias ejemplares incluyen una célula de origen mieloide o linfoide, por ejemplo linfocitos (tales como células B y células T, que incluyen las células T citolíticas (CTLs)), células citotóxicas, células citotóxicas naturales, macrófagos, monocitos, mastocitos y granulocitos, tales como neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores de Fc específicos (FcRs) y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. En ciertas realizaciones, una célula efectora es capaz de inducir ADCC, tal como una célula citotóxica natural. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, que expresan FcRs, están implicados en la destrucción específica de las células objetivo, y en la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmunitario. En ciertas realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno objetivo o una célula objetivo. La expresión de un FcR particular en una célula efectora se puede regular mediante factores humorales tales como citocinas. Una célula efectora puede fagocitar un antígeno objetivo, o fagocitar o lisar una célula objetivo. Los agentes citotóxicos adecuados y los segundos agentes terapéuticos se ejemplifican más adelante, e incluyen toxinas (tales como péptidos radiomarcados), agentes quimioterápicos y profármacos.

En ciertas realizaciones, el segundo sitio de unión al antígeno se une a un antígeno en una célula B humana, tal como, p.ej., CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD46, CD80, CD138 y HLA-DR.

En ciertas realizaciones, el segundo sitio de unión al antígeno se une a un antígeno específico de tejido, que estimula la localización del anticuerpo biespecífico en un tejido específico.

En ciertas realizaciones, el segundo sitio de unión al antígeno se une a un antígeno localizado en el mismo tipo de célula que la célula que expresa Nectina-4, en general un antígeno asociado a tumores (TAA), pero tiene una especificidad de unión diferente de la del primer sitio de unión al antígeno. Tales anticuerpos multi- o biespecíficos pueden incrementar la especificidad de la unión a las células tumorales, y/o implicarse en múltiples rutas efectoras. Los TAAs ejemplares incluyen el antígeno carcinoembriónico (CEA), el antígeno prostático específico (PSA), RAGE (antígeno renal), α -fetoproteína, CAMEL (antígeno reconocido por CTL en melanoma), antígenos CT (tales como MAGE-B5, -B6, -C2, -C3, y D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSX-2, GAGE, BAGE, MAGE, y SAGE), antígenos de mucina (p.ej., MUC1, mucina-CA125, etc.), antígenos de gangliósidos, tirosinasa, gp75, c-Met, Marti, MelanA, MUM-1, MUM-2, MUM-3, HLA-B7, Ep-CAM o una integrina asociada al cáncer, tal como integrina $\alpha 5\beta 3$. De manera alternativa, el segundo sitio de unión al antígeno se une a un epítipo diferente de Nectina-4. El segundo sitio de unión al antígeno puede unirse de manera alternativa a un factor angiogénico u otro factor de crecimiento asociado al cáncer, tal como un factor de crecimiento endotelial vascular, un factor de crecimiento de fibroblastos, un factor de crecimiento epidérmico, angiogenina o un receptor de cualquiera de estos, especialmente receptores asociados a la progresión del cáncer.

En ciertas realizaciones, el segundo sitio de unión al antígeno es de un segundo anticuerpo monoclonal humano o ADC de la invención, tal como el anticuerpo de la presente invención.

Los formatos ejemplares para las moléculas de anticuerpos multiespecíficos de la invención incluyen, pero sin limitación, (i) dos anticuerpos entrecruzados mediante heteroconjugación química, uno con especificidad hacia Nectina-4 y otro con especificidad hacia un segundo antígeno; (ii) un único anticuerpo que comprende dos regiones diferentes de unión al antígeno; (iii) un anticuerpo de cadena simple que comprende dos regiones diferentes de unión al antígeno, p.ej., dos scFvs unidos en tándem mediante un ligador peptídico extra; (iv) un anticuerpo de dominio variable doble (DVD-Ig), en el que cada cadena ligera y cada cadena pesada contienen dos dominios variables en tándem por medio de una unión peptídica corta (Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, en: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (v) un fragmento (Fab')₂ biespecífico unido químicamente; (vi) un Tandab, que es una fusión de dos diacuerpos de cadena simple que da como resultado un anticuerpo biespecífico tetravalente que tiene dos sitios de unión para cada uno de los antígenos objetivo; (vii) un flexicuerpo, que es una combinación de scFvs con un diacuerpo que da como resultado una molécula multivalente; (viii) una molécula denominada "acoplamiento y cierre", basada en el "dominio de dimerización y acoplamiento" de la Proteína Quinasa A, que, cuando se aplica a Fabs, puede proporcionar una proteína de unión biespecífica trivalente que consiste en dos fragmentos Fab idénticos unidos a un fragmento Fab diferente; (ix) una molécula denominada Escorpión, que comprende, p.ej., dos scFvs fusionados a ambos extremos de un brazo de Fab humano; y (x) un diacuerpo. Otro formato ejemplar para los anticuerpos biespecíficos son las moléculas similares a IgG con dominios CH₃ complementarios para forzar la heterodimerización. Tales moléculas se pueden preparar mediante el uso de tecnologías conocidas, tales como, p.ej., las conocidas como las tecnologías Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech), Knob-into-Hole (Genentech), CrossMAb (Roche) y de coincidencia electrostática (Amgen), LUZ-Y (Genentech), anticuerpo con dominio modificado mediante intercambio de cadenas (SEEDbody) (EMD Serono), Biclonic (Merus) y DuoBody (Genmab A/S).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo biespecífico se obtiene o es obtenible por medio de un intercambio de brazos Fab controlado, en general mediante el uso de la tecnología DuoBody. Los métodos in vitro para producir anticuerpos biespecíficos mediante el intercambio de brazos Fab controlado se han descrito en los documentos WO2008119353 y WO 2011131746 (ambos de Genmab A/S). En un método ejemplar, descrito en el documento WO 2008119353, se forma un anticuerpo biespecífico mediante el intercambio de "brazos Fab" o "semi-moléculas" (intercambio de una cadena pesada y una cadena ligera unida) entre dos anticuerpos mono-específicos, que comprenden ambos regiones CH₃ similares a IgG₄, tras la incubación en condiciones reductoras. El producto resultante es un anticuerpo biespecífico que tiene dos brazos Fab que pueden comprender diferentes secuencias. En otro método ejemplar, descrito en el documento WO 2011131746, los anticuerpos biespecíficos de la presente invención se preparan mediante un método que comprende las siguientes etapas, en el que al menos uno del primer y segundo anticuerpos es el anticuerpo de la presente invención: a) proporcionar un primer anticuerpo que comprende una región Fc de una inmunoglobulina, y dicha región Fc comprende una primera región CH₃; a) proporcionar un segundo anticuerpo que comprende una región Fc de una inmunoglobulina, y dicha región Fc comprende una segunda región CH₃; en el que las secuencias de dicha primera y segunda regiones CH₃ son diferentes y son tales que la interacción heterodimérica entre dicha primera y segunda regiones CH₃ es más fuerte que cada una de las interacciones homodiméricas de dicha primera y segunda regiones CH₃; c) incubar primer dicho anticuerpo junto con dicho segundo anticuerpo en condiciones reductoras; y d) obtener dicho anticuerpo biespecífico, en el que el primer anticuerpo es el anticuerpo de la presente invención y el segundo anticuerpo tiene una especificidad de unión diferente, o viceversa. Las condiciones reductoras se pueden proporcionar, por ejemplo, añadiendo un agente reductor, p.ej. seleccionado de 2-mercaptoetilamina, ditiotreitól y tris(2-carboxietil)fosfina. La etapa d) puede comprender además restablecer las condiciones para que sean no reductoras o menos reductoras, por ejemplo mediante la eliminación de un agente reductor, p.ej. mediante desalación. Preferiblemente, las secuencias de la primera y segunda regiones CH₃ son diferentes, que comprenden solamente unas cuantas mutaciones asimétricas bastante conservativas, de forma que la interacción heterodimérica entre dicha primera y segunda regiones CH₃ es más intensa que cada una de las interacciones homodiméricas de dicha primera y segunda regiones CH₃. Se proporcionan más detalles sobre estas interacciones y cómo se pueden llevar a cabo en el documento WO 2011131746. Lo siguiente son realizaciones ejemplares de combinaciones de tales mutaciones asimétricas, opcionalmente en las que una o ambas regiones Fc son del isotipo IgG₁.

En ciertas realizaciones, la primera región Fc tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405, 407 y 409, y la segunda región Fc tiene una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 366, 368, 370, 399, 405, 407 y 409, y en el que la primera y segunda regiones Fc no están sustituidas en las mismas posiciones.

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

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

En ciertas realizaciones, tanto la primera como la segunda región Fc son de isotipo IgG₁, y la primera región Fc tiene una Leu en la posición 405, y la segunda región Fc tiene una Arg en la posición 409.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención se conjuga a un resto terapéutico, es decir, un fármaco. El resto terapéutico puede ser, p.ej., una citotoxina, un agente quimioterápico, una citocina, un inmunosupresor, un agente estimulante inmunitario, un péptido lítico, o un radioisótopo. Tales conjugados se denominan en la presente memoria "conjugados anticuerpo-fármaco" o "ADCs".

5 En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a un resto citotóxico. El resto citotóxico se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en taxol; citocalasina B; gramicidina D; bromuro de etidio; emetina; mitomicina; etopósido; tenopósido; vincristina; vinblastina; colchicina; doxorubicina; daunorubicina; dihidroxi antracina diona; un inhibidor de tubulina tal como maitansina o un análogo o derivado de la misma; un agente antimetabólico tal como monometil auristatina E o F o un análogo o derivado de la misma; dolastatina 10 o 15 o un análogo de la misma; irinotecano o un análogo del mismo; mitoxantrona; mitramicina; actinomicina D; 1-deshidrotestosterona; un glucocorticoide; procaína; tetracaína; lidocaína; propranolol; puromicina; caliqueamicina o un análogo o derivado de la misma; un antimetabolito tal como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina, hidroxiaurea, asparaginasa, gemcitabina, o cladribina; un agente alquilante tal como mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C; un derivado de platino tal como cisplatino o carboplatino; duocarmicina A, duocarmicina SA, rachelmicina (CC-1065), o un análogo o derivado de las mismas; un antibiótico tal como dactinomicina, bleomicina, daunorubicina, doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC); pirrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepinas (PDB); toxina de la difteria y moléculas relacionadas, tales como cadena A de la difteria y fragmentos activos de la misma y moléculas híbridas, toxina de ricina tal como ricina A o una toxina de la cadena A desglucosilada de la ricina, toxina del cólera, una toxina de tipo Shiga tal como SLT I, SLT II, SLT IIV, toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina de la tos ferina, toxina del tétanos, inhibidor de proteasas de tipo Bowman-Birk de soja, exotoxina de *Pseudomonas*, alorina, saporina, modeccina, gelanina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* tales como PAPI, PAPII, y PAP-S, inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, y toxinas de enomicina; ribonucleasa (RNasa); DNasa I, enterotoxina A estafilocócica; proteína antiviral de *Phytolacca americana*; toxina de la difteria; y endotoxina de *Pseudomonas*.

10 En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a una auristatina o un análogo peptídico, derivado o profármaco de la misma. Se ha demostrado que las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis de GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12): 3580-3584) y tienen actividad antineoplásica (documento US5663149) y antifúngica (Pettit et al., (1998) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 42: 2961-2965). Por ejemplo, se puede hacer reaccionar la auristatina E con ácido para-acetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados típicos de auristatina incluyen AFP, MMAF (monometil auristatina F), y MMAE (monometil auristatina E). Las auristatinas adecuadas y los análogos, derivados y profármacos de auristatina, así como los ligadores adecuados para la conjugación de las auristatinas a los Abs, se describen, p.ej., en las patentes de EE.UU. n°s 5.635.483, 5.780.588 y 6.214.345 y en las publicaciones de solicitudes de patentes internacionales WO2008172, WO2004010957, WO2005081711, WO2005084390, WO2006132670, WO03026577, WO200700860, WO207011968 y WO205082023.

15 En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a Mertansina (también denominada emtansina o DM1) o un análogo, derivado o profármaco peptídico de la misma. Mertansina es un inhibidor de tubulina, lo que significa que inhibe el ensamblaje de los microtúbulos uniéndose a la tubulina.

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

25 En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a un resto citotóxico seleccionado del grupo que consiste en una antraciclina, maitansina, caliqueamicina, duocarmicina, rachelmicina (CC-1065), dolastatina 10, dolastatina 15, irinotecano, monometil auristatina E, monometil auristatina F, una PDB, o un análogo, derivado, o profármaco de cualquiera de los mismos.

30 En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a una antraciclina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a maitansina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a caliqueamicina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a duocarmicina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a rachelmicina (CC-1065) o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a dolastatina 10 o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a dolastatina 15 o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a monometil auristatina E o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a monometil auristatina F o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a pirrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepina o un análogo, derivado o profármaco de la misma. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga

a irinotecano o un análogo, derivado o profármaco del mismo.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a un ácido nucleico o molécula asociada a ácido nucleico. En tal realización, el ácido nucleico conjugado es una ribonucleasa (RNasa) o desoxi-ribonucleasa citotóxica (p.ej., DNasa I), un ácido nucleico inverso, una molécula de ARN inhibitorio (p.ej., una molécula de siARN) o un ácido nucleico inmunoestimulador (p.ej., una molécula de ADN que contiene motivos CpG inmunoestimuladores). En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a un aptámero o una ribozima.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga, p.ej., en forma de una proteína de fusión, a un péptido lítico tal como CLIP, Magainina 2, melitina, Cecropina y P18.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a una citocina, tal como, p.ej., IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFNa, IFN3, IFNy, GM-CSF, CD40L, ligando Flt3, factor de células madre, aneastim, y TNFa.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo se conjuga a un radioisótopo o a un quelato que contiene un radioisótopo. Por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar a un ligador quelante, p.ej. DOTA, DTPA o tiuxetano, que permite que el anticuerpo se compleje con un radioisótopo. El anticuerpo puede comprender o estar conjugado además o de manera alternativa a uno o más aminoácidos radiomarcados u otras moléculas radiomarcadas. Los ejemplos no limitantes de radioisótopos incluyen ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{125}I , ^{131}I , ^{186}Re , ^{213}Bi , ^{225}Ac y ^{227}Th . Para fines terapéuticos, se puede usar un radioisótopo que emite radiación de partículas beta o alfa, p.ej., ^{131}I , ^{90}Y , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{67}Cu , ^{186}Re , ^{188}Re , y ^{212}Pb .

Se conocen bien en la técnica los métodos para la conjugación de moléculas a anticuerpos (véase, p.ej., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2ª ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera et al. eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985); y Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. Véase además, p.ej., la publicación PCT WO 89/12624). En general, la molécula de ácido nucleico se une de manera covalente a las lisinas o cisteínas del anticuerpo, a través de una funcionalidad de éster de N-hidroxisuccinimida o maleimida, respectivamente. Se ha informado de métodos de conjugación mediante el uso de cisteínas modificadas o la incorporación de aminoácidos artificiales para mejorar la homogeneidad del conjugado (Axup, J.Y., Bajjuri, K.M., Ritland, M., Hutchins, B.M., Kim, C.H., Kazane, S.A., Halder, R., Forsyth, J.S., Santidrian, A.F., Stafin, K., et al. (2012). Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 16101-16106.; Junutula, J.R., Flagella, K.M., Graham, R.A., Parsons, K.L., Ha, E., Raab, H., Bhakta, S., Nguyen, T., Dugger, D.L., Li, G., et al. (2010). Engineered thio-trastuzumab-DMI conjugate with an improved therapeutic index to target human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 16, 4769-4778.). Junutula et al. (2008) desarrolló una conjugación específica de sitio basada en cisteína denominada "THIOMABS" (TDCs), que se afirma que muestra un índice terapéutico mejorado en comparación con los métodos de conjugación convencionales. La conjugación a aminoácidos artificiales que se han incorporado en el anticuerpo también se está explorando para los ADCs; sin embargo, todavía se debe establecer la generalidad de esta aproximación (Axup et al., 2012). En particular, un experto en la técnica también puede idear un polipéptido que contiene Fc modificado con una etiqueta que contiene glutamina donante de acilo (p.ej., etiquetas peptídicas que contienen Gin o etiquetas Q) o una glutamina endógena que se hace reactiva mediante ingeniería de polipéptidos (p.ej., por medio de la delección, inserción, sustitución, o mutación de aminoácidos del polipéptido). Después una transglutaminasa lo puede entrecruzar de manera covalente con un agente donante de amina (p.ej., una molécula pequeña que comprende o que está unida a una amina reactiva) para formar una población estable y homogénea de un conjugado polipeptídico que contiene Fc modificado, y el agente donante de amina se conjuga con especificidad de sitio al polipéptido que contiene Fc a través de la etiqueta que contiene la glutamina donante de acilo o la glutamina endógena accesible/expuesta/reactiva (documento WO 2012059882).

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

El anticuerpo de la presente invención se puede usar en el tratamiento o la prevención de trastornos que implican células que expresan Nectina-4.

Tal como se usa en la presente memoria, los términos "tratamiento" o "tratar" se refieren al tratamiento tanto profiláctico como preventivo, así como al tratamiento curativo o modificador de una enfermedad, que incluye el tratamiento de un paciente en riesgo de haber contraído la enfermedad o que se sospecha que ha contraído la enfermedad, así como los pacientes que están enfermos o a los que se les ha diagnosticado que padecen una enfermedad o afección médica, e incluye la eliminación de la recidiva clínica. El tratamiento se puede administrar a un sujeto que tiene un trastorno médico o que finalmente puede contraer el trastorno, para prevenir, curar, retrasar el inicio, reducir la gravedad, o mejorar uno o más síntomas de un trastorno o trastorno recurrente, o para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de la esperada en ausencia de tal tratamiento. Un "régimen terapéutico" significa el patrón de tratamiento de una enfermedad, p.ej., el patrón de dosificación usado durante la terapia. Un régimen terapéutico puede incluir un

régimen de inducción y un régimen de mantenimiento. La frase "régimen de inducción" o "periodo de inducción" se refiere a un régimen terapéutico (o la porción de un régimen terapéutico) que se usa para el tratamiento inicial de una enfermedad. El objetivo general de un régimen de inducción es proporcionar un nivel elevado de fármaco a un paciente durante el periodo inicial de un régimen de tratamiento. Un régimen de inducción puede emplear (en parte o completamente) un "régimen de carga", que puede incluir administrar una dosis mayor del fármaco de la que emplearía un médico durante un régimen de mantenimiento, administrar un fármaco con más frecuencia con la que un médico administraría el fármaco durante un régimen de mantenimiento, o ambos. La frase "régimen de mantenimiento" o "periodo de mantenimiento" se refiere a un régimen terapéutico (o la porción de un régimen terapéutico) que se usa para el mantenimiento de un paciente durante el tratamiento de una enfermedad, p.ej., para mantener al paciente en remisión durante periodos largos de tiempo (meses o años). Un régimen de mantenimiento puede emplear una terapia continua (p.ej., la administración de un fármaco a intervalos regulares, p.ej., semanalmente, mensualmente, anualmente, etc.) o una terapia intermitente (p.ej., tratamiento interrumpido, tratamiento intermitente, tratamiento en la recidiva, o tratamiento tras la consecución de un criterio predeterminado particular [p.ej., dolor, manifestación de la enfermedad, etc.]).

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método para destruir una célula que expresa Nectina-4 poniendo en contacto la célula con el anticuerpo de la presente invención. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método para destruir una célula que expresa Nectina-4 poniendo en contacto la célula con el anticuerpo de la presente invención en presencia de células efectoras capaces de inducir una respuesta de células efectoras mediada por Fc, tal como una respuesta CDC, ADCC o ADCP. En esta realización, el anticuerpo es en general de longitud completa y de un isotipo que conduce a una respuesta CDC o ADCC, tal como, p.ej., un isotipo IgG1. En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método para destruir una célula que expresa Nectina-4 poniendo en contacto la célula con un ADC de la invención.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención es especialmente adecuado para el tratamiento del cáncer. Las células cancerosas que sobreexpresan Nectina-4 son, de hecho, buenos objetivos para los anticuerpos de la presente invención, debido a que se pueden unir más anticuerpos por célula. Por tanto, en un aspecto, el trastorno que implica células que expresan Nectina-4 es un cáncer, es decir, un trastorno tumorigénico, tal como un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan Nectina-4 que incluyen, por ejemplo, los trastornos en los que las células son de un tumor sólido o de un tumor hematológico. En particular, el anticuerpo de la presente invención se puede usar como tratamiento de enfermedades hiperproliferativas asociadas a la expresión, sobreexpresión o activación de Nectina-4. En particular, el anticuerpo de la presente invención es especialmente adecuado para el tratamiento del cáncer de mama, cáncer ovárico y cáncer de pulmón. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "cáncer de mama" incluye, pero sin limitación, todos los tipos de cáncer de mama en todas las etapas de progresión, como el cáncer de mama metastásico o los carcinomas de mama. En particular, el cáncer de mama se selecciona de los cánceres de mama triple negativos (TNBC) que se distinguen por una tinción inmunohistoquímica negativa para los receptores de estrógeno y progesterona y el receptor de factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2), y representan un 15% de todos los cánceres de mama. La expresión "cáncer ovárico", tal como se usa en la presente memoria, incluye, pero sin limitación, todos los tipos de cánceres ováricos en todas las etapas de progresión, como el cáncer ovárico metastásico o los carcinomas ováricos. La expresión "cáncer de pulmón", tal como se usa en la presente memoria, incluye, pero sin limitación, todos los tipos de cánceres de pulmón en todas las etapas de progresión, como los carcinomas de pulmón, cáncer de pulmón metastásico, carcinomas de pulmón no microcíticos o carcinoma de pulmón microcítico.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención es especialmente adecuado para el tratamiento de un cáncer metastásico.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la presente invención puede variar según factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo, y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo de la presente invención de provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o una porción del anticuerpo se compensa por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Las dosis y regímenes de dosis eficaces para el anticuerpo de la presente invención dependen de la enfermedad o afección a tratar, y las personas expertas en la técnica pueden determinarlos. Un médico que tiene experiencia habitual en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico podría iniciar las dosis del anticuerpo de la presente invención empleado en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los necesarios para conseguir el efecto terapéutico deseado, e incrementar gradualmente la dosis hasta conseguir el efecto deseado. En general, una dosis adecuada de una composición de la presente invención será la cantidad del compuesto que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico según un régimen de dosis particular. Tal dosis eficaz dependerá en general de los factores descritos anteriormente. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz para el uso terapéutico se puede medir por su capacidad de estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto de inhibir el cáncer se puede determinar, por ejemplo, en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en los tumores humanos. De manera alternativa, esta propiedad de una composición se puede determinar examinando la capacidad del compuesto de inhibir el crecimiento de células tumorales mediante ensayos in vitro conocidos para el médico experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de otra manera

los síntomas en un sujeto. Alguien de experiencia habitual en la técnica sería capaz de determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición particular o la vía de administración seleccionada. Un intervalo ejemplar, no limitante, para una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la presente invención es alrededor de 0,1-100 mg/kg, tal como alrededor de 0,1-50 mg/kg, por ejemplo alrededor de 0,1-20 mg/kg, tal como alrededor de 0,1-10 mg/kg, por ejemplo alrededor de 0,5, tal como alrededor de 0,3, alrededor de 1, alrededor de 3 mg/kg, alrededor de 5 mg/kg o alrededor de 8 mg/kg. Un intervalo ejemplar, no limitante, para una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la presente invención es 0,02-100 mg/kg, tal como alrededor de 0,02-30 mg/kg, tal como alrededor de 0,05-10 mg/kg o 0,1-3 mg/kg, por ejemplo alrededor de 0,5-2 mg/kg. La administración puede ser, p.ej., intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea, y por ejemplo se administra en posición proximal a la localización del objetivo. Los regímenes de dosis en los anteriores métodos de tratamiento y los usos se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (p.ej., una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar una única inyección rápida, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis se puede reducir o incrementar de manera proporcional, tal como lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. En ciertas realizaciones, la eficacia del tratamiento se monitoriza durante la terapia, p.ej. en puntos predefinidos en el tiempo. En ciertas realizaciones, la eficacia se puede monitorizar midiendo el nivel de Nectina-4 en una muestra que contiene células tumorales, mediante la visualización del área de la enfermedad, o mediante otros métodos de diagnóstico descritos adicionalmente en la presente memoria, p.ej. llevando a cabo uno o más barridos PET-CT, por ejemplo mediante el uso de un anticuerpo marcado de la presente invención, fragmento o mini-anticuerpo derivado del anticuerpo de la presente invención. Si se desea, se puede administrar una dosis diaria eficaz de una composición farmacéutica en forma de dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis administradas por separado a intervalos adecuados a lo largo del día, opcionalmente, en formas farmacéuticas unitarias. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se administran mediante una infusión continua lenta a lo largo de un periodo largo, tal como más de 24 horas, para minimizar cualquier efecto secundario indeseado. También se puede administrar una dosis eficaz del anticuerpo de la presente invención mediante el uso de un periodo de dosificación semanal, bisemanal o trisemanal. El periodo de dosificación se puede limitar, p.ej., a 8 semanas, 12 semanas o hasta que se haya establecido una progresión clínica. Como ejemplos no limitantes, el tratamiento según la presente invención se puede proporcionar en forma de una dosis diaria de un compuesto de la presente invención en una cantidad de alrededor de 0,1-100 mg/kg, tal como 0,2, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, al día, en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, o 40, o de manera alternativa, al menos una de las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 tras el inicio del tratamiento, o cualquier combinación de los mismos, mediante el uso de dosis individuales o divididas cada 24, 12, 8, 6, 4, o 2 horas, o cualquier combinación de los mismos.

La invención también proporciona aplicaciones terapéuticas en las que se usa el anticuerpo de la presente invención en combinación con al menos un agente terapéutico adicional relevante para la enfermedad o el trastorno tratar, como se describió anteriormente. Tal administración puede ser simultánea, separada o secuencial. Para la administración simultánea, los agentes se pueden administrar en forma de una composición o en forma de composiciones distintas, según sea adecuado. El agente terapéutico adicional en general es relevante para el trastorno a tratar. Los agentes terapéuticos ejemplares incluyen otros anticuerpos antineoplásicos o ADCs, agentes citotóxicos, agentes quimioterápicos, agentes anti-angiogénicos, inmunógenos antineoplásicos, agentes de control del ciclo celular/reguladores de la apoptosis, agentes reguladores hormonales, y otros agentes descritos más adelante.

Para la administración, el anticuerpo de la presente invención se formula como una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención se puede formular según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, por lo cual se combina la molécula terapéutica en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se dice que una composición es un "vehículo farmacéuticamente aceptable" si su administración puede ser tolerada por un paciente receptor. La solución salina tamponada con fosfato estéril es un ejemplo de un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la técnica conocen bien otros vehículos adecuados. (Véase, p.ej., Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, 19^a ed. 1995)). Las formulaciones pueden incluir además uno o más excipientes, conservantes, solubilizantes, agentes tamponadores, albúmina para prevenir la pérdida de proteínas en las superficies del vial, etc. La forma de las composiciones farmacéuticas, la vía de administración, la dosis y el régimen dependen naturalmente de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, la edad, el peso, y el sexo del paciente, etc. Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular para una administración tópica, oral, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraocular, y similares.

En general, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de ser inyectada. Estas pueden ser en particular isotónicas, estériles, soluciones salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro sódico, potásico, cálcico o magnésico, y similares, o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que tras la adición, dependiendo del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

Las dosis usadas para la administración se pueden adaptar en función de diversos parámetros, y en particular en función del modo de administración usado, de la patología relevante, o alternativamente de la duración deseada del tratamiento.

Para preparar las composiciones farmacéuticas, se puede disolver o dispersar una cantidad eficaz del anticuerpo en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable.

5 Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilen glicol acuoso; y polvos estériles para la preparación improvisada de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida, de manera que se pueda utilizar fácilmente con una jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe preservar de la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

10 Las disoluciones de los compuestos activos en forma de base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua mezclada de manera adecuada con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilen glicoles líquidos, y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

15 Un anticuerpo de la invención se puede formular en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden obtener a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxido sódico, potásico, amónico, cálcico, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

20 El vehículo también puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol, y polietilen glicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede llevar a cabo mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo usando en las composiciones agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

30 Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con diversos ingredientes de los enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización mediante filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y liofilización, que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una disolución de los mismos previamente esterilizada mediante filtración.

También se contempla la preparación de disoluciones más concentradas o muy concentradas para la inyección directa, en las que se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, que administra concentraciones elevadas de los agentes activos en una pequeña área de tumor.

40 Tras la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación farmacéutica, y en una cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una diversidad de formas farmacéuticas, tales como el tipo de disoluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármacos y similares.

45 Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución se debería tamponar de manera adecuada si es necesario, y el diluyente líquido primero se haría isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que se pueden emplear serán conocidos para los expertos en la técnica teniendo en cuenta la presente descripción. Por ejemplo, se podría disolver una dosis en 1 ml de disolución isotónica de NaCl y añadirla a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarla en el sitio propuesto de infusión, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Se dará necesariamente cierta variación en la dosis dependiendo de la afección del sujeto a tratar. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual.

55 Los anticuerpos de la invención se pueden formular en una mezcla terapéutica para que comprenda alrededor de 0,0001 a 1,0 miligramos, o alrededor de 0,001 a 0,1 miligramos, o alrededor de 0,1 a 1,0 o incluso alrededor de 10 miligramos por dosis más o menos. También se pueden administrar múltiples dosis.

Además de los compuestos formulados para administración parenteral, tal como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, p.ej., comprimidos u otros sólidos para

administración oral; cápsulas de liberación retardada; y cualquier otra forma usada actualmente.

En ciertas realizaciones, se contempla el uso de liposomas y/o nanopartículas para la introducción de los anticuerpos en las células hospedadoras. Los expertos en la técnica conocen la formación y el uso de liposomas y/o nanopartículas.

5 Las nanocápsulas pueden atrapar en general los compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debido a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (de tamaños de alrededor de 0,1 μm) en general se diseñan mediante el uso de polímeros capaces de degradarse in vivo. Las nanopartículas biodegradables de poli(cianoacrilato de alquilo) que cumplen estos requisitos se contemplan para el uso en la presente invención, y se pueden producir fácilmente tales partículas.

10 Se forman Liposomas a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y espontáneamente forman vesículas de bicapas concéntricas multilamelares (también denominadas vesículas multilamelares (MLVs)). Las MLVs tienen en general diámetros desde 25 nm hasta 4 μm . La sonicación de las MLVs da como resultado la formación de vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å , que contienen una disolución acuosa en el núcleo. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, la fuerza iónica y la presencia de
15 cationes divalentes.

La presente invención también proporciona receptores de antígenos quiméricos (CARs) que comprenden un dominio de unión al antígeno del anticuerpo de la presente invención. En general, dicho receptor de antígeno quimérico comprende la secuencia de VH y VL del anticuerpo de la presente invención. El receptor de antígeno quimérico de la presente invención también comprende un dominio de bisagra extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización de células T intracelular.
20

Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "receptor de antígeno quimérico" o "CAR" tiene su significado general en la técnica, y se refiere a una proteína o polipéptido híbrido construido de manera artificial que contiene los dominios de unión al antígeno de un anticuerpo (p.ej., scFv) unidos a dominios de señalización de células T. Las características de los CARs incluyen su capacidad de redirigir la especificidad y reactividad de las células T hacia un objetivo seleccionado sin limitación por el MHC, aprovechando las propiedades de unión al antígeno de los anticuerpos monoclonales. El reconocimiento del antígeno sin limitación por el MHC proporciona a las células T que expresan CARs la capacidad de reconocer un antígeno independientemente del procesamiento del antígeno, y por tanto se evita un mecanismo importante de escape tumoral. Además, cuando se expresan en las células T, los CARs de manera ventajosa no se dimerizan con las cadenas alfa y beta del receptor de células T (TCR) endógeno.
25

30 En ciertas realizaciones, la invención proporciona CARs que comprenden un dominio de unión al antígeno que comprende, que consiste en, o que consiste básicamente en, un fragmento variable de cadena simple (scFv) del anticuerpo N41mab. En ciertas realizaciones, el dominio de unión al antígeno comprende un péptido ligador. El péptido ligador se puede colocar entre la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada.

En ciertas realizaciones, el CAR comprende un dominio de bisagra extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio de señalización de células T intracelular seleccionado del grupo que consiste en los dominios intracelulares CD28, 4-1BB, y CD3 ζ . CD28 es un marcador de células T importante en la co-estimulación de células T. 4-1BB transmite una señal coestimuladora potente a las células T, que estimula la diferenciación y mejora la supervivencia a largo plazo de los linfocitos T. CD3 ζ se asocia con los TCRs para producir una señal, y contiene motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (ITAMs).
35

40 En ciertas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico de la presente invención puede estar glicosilado, amidado, carboxilado, fosforilado, esterificado, N-acilado, ciclado, p.ej., por medio de un puente disulfuro, o convertido en una sal de adición de ácido y/u opcionalmente dimerizado o polimerizado.

La invención también proporciona un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico de la presente invención. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico se incorpora en un vector como tal, como se describió anteriormente.
45

La presente invención también proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico de la presente invención. Aunque la célula hospedadora puede ser cualquier tipo de célula, puede originarse de cualquier tipo de tejido, y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, la célula hospedadora es una célula T, p.ej. aislada de linfocitos de sangre periférica (PBL) o células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En ciertas realizaciones, la célula T puede ser cualquier célula T, tal como una célula T cultivada, p.ej., una célula T primaria, o una célula T de una línea de células T cultivadas, p.ej., Jurkat, SupT1, etc., o una célula T obtenida de un mamífero. Si se obtiene de un mamífero, la célula T se puede obtener de numerosas fuentes, que incluyen, pero sin limitación, sangre, médula ósea, nódulo linfático, timo, u otros tejidos o fluidos. Las células T también se pueden enriquecer o purificar. La célula T puede ser cualquier tipo de célula T, y puede estar en cualquier etapa de desarrollo, que incluye, pero sin limitación, células T positivas dobles CD4+/CD8+, células T auxiliares CD4+, p.ej., células Th2, células T CD8+ (p.ej., células T citotóxicas), células infiltrantes de tumores, células T de memoria, células T indiferenciadas, y similares. La célula T puede ser una célula T CD8+ o una célula T CD4+.
50
55

La población de esas células T preparadas como se describió anteriormente se puede utilizar en los métodos y las composiciones para la inmunoterapia adoptiva de acuerdo con las técnicas conocidas, o variaciones de las mismas que serán evidentes para los expertos en la técnica basándose en la presente descripción. Véase, p.ej., la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2003/0170238 de Gruenberg et al; véase también la patente de EE.UU. n.º 4.690.915 de Rosenberg. La inmunoterapia adoptiva del cáncer se refiere a una aproximación terapéutica en la que las células inmunitarias con reactividad antitumoral se administran a un hospedador que alberga un tumor, con el objetivo de que las células medien, directamente o indirectamente, en la regresión de un tumor establecido. La transfusión de linfocitos, especialmente linfocitos T, se halla en esta categoría. En la actualidad, la mayoría de inmunoterapias adoptivas son terapias de autolinfocitos (ALT) dirigidas a tratamientos que usan las propias células inmunitarias del paciente. Estas terapias implican el procesamiento de los propios linfocitos del paciente para incrementar la respuesta mediada por células inmunitarias o para reconocer antígenos específicos o sustancias exógenas en el cuerpo, lo que incluye las células cancerosas. Los tratamientos se llevan a cabo retirando linfocitos del paciente y exponiendo a estas células in vitro a sustancias biológicas y fármacos para activar la función inmunitaria de las células. Una vez que se activan las células autólogas, estas células activadas ex vivo se reinfunden en el paciente para mejorar el sistema inmunitario para tratar el cáncer. En ciertas realizaciones, las células se formulan recogiendo primero de su medio de cultivo, y después lavando y concentrando las células en un medio y sistema recipiente adecuado para la administración (un vehículo "farmacéuticamente aceptable") en una cantidad eficaz para el tratamiento. El medio de infusión adecuado puede ser cualquier formulación de medio isotónico, en general solución salina normal, Normosol R (Abbott) o Plasma-Lyte A (Baxter), pero también se puede utilizar dextrosa al 5% en agua o lactato de Ringer. El medio de infusión se puede complementar con albúmina de suero humano. Una cantidad eficaz para el tratamiento de las células de la composición depende de la representación relativa de las células T con la especificidad deseada, de la edad y el peso del receptor, de la gravedad de la afección seleccionada como objetivo y de la inmunogenicidad de los Ags seleccionados como objetivo. Esta cantidad de células puede ser tan baja como aproximadamente 10^3 /kg, preferiblemente 5×10^3 /kg; y tan alta como 10^7 /kg, preferiblemente 10^8 /kg. El número de células dependerá del uso final al que se destina la composición, al igual que el tipo de células incluidas en ella. Por ejemplo, si se desean células que son específicas para un Ag particular, la población contendrá más del 70%, en general más del 80%, 85% y 90-95% de tales células. Para los usos proporcionados en la presente memoria, las células están en general en un volumen de un litro o menos, y puede ser 500 ml o menos, incluso 250 ml o 100 ml o menos. El número clínicamente relevante de células inmunitarias se puede distribuir en infusiones múltiples que igualan o superan acumulativamente la cantidad total deseada de células.

En particular, las células de la presente invención son especialmente adecuadas para el tratamiento del cáncer. Por tanto, la presente solicitud describe un método de tratamiento del cáncer en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una población de células de la presente invención.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las figuras y ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no se deberían interpretar de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

Figuras:

Figura 1: N41mab reconoce el dominio similar a IgV de nectina-4

A: Detección mediante ELISA. Se revistieron placas de noventa y seis pocillos con $5 \mu\text{g/ml}$ de V-Fc de nectina-4 o V-Fc de nectina-1 (que comprendieron solamente el dominio de IgV) durante la noche a $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ como se indica. N41mab reconoce el V-Fc de nectina-4 (barra 3), pero no el V-Fc de nectina-1 (barra 1).

B: Detección mediante FACS. Análisis FACS de la línea celular MDAMB231 transfectada con el epítipo marcado con FLAG N-terminal de Nectina-4 mediante el uso de $2 \mu\text{g/ml}$ de anticuerpo N41mab. Las células se tiñeron después con anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con ficoeritrina (Beckman-Coulter). Izquierda: células MDAMB231, derecha: células MDAMB231-nectina-4. (--- Ctrl Ig) (-N41mab).

Figura 2: N41mab bloquea la invasión de células tumorales in vitro

La invasión se midió con la cámara de invasión revestida de Matrigel. La expresión ectópica de nectina4 incrementa notablemente la invasión celular (compárese la barra 1 con la barra 3). El tratamiento de las células MDAMB231-nectina4 con $10 \mu\text{g/ml}$ de N41mab antes del ensayo de invasión induce un 43% de inhibición de la invasión (compárese la barra 3 y la barra 4). Este resultado es representativo de 3 experimentos.

Figura 3: N41mab inhibe la progresión metastásica desde un sitio primario in vivo

Se xenoinjertaron de manera subcutánea células MDAMB231 y MDAMB231-nectina4 que expresaban luciferasa (1×10^6 células) en ratones NSG. Se inyectó IP N41mab (10 mg/kg) cada semana. Se llevó a cabo el análisis de bioluminiscencia en el día 74 tras el injerto. Se representan los pulmones, y se menciona el porcentaje de órganos positivos en presencia y ausencia de tratamiento con N41mab.

El histograma resume los datos obtenidos. El tratamiento de ratones NSG con N41mab reduce el porcentaje de ratones con metástasis pulmonar. Del 71% al 25%. Este resultado es representativo de 2 experimentos.

Figura 4: N41mab inhibe la metástasis in vivo

5 Se inyectaron células SUM190 que expresaban luciferasa ($0,5 \times 10^6$ células) en la vena caudal en ratones NSG. Se llevó a cabo el tratamiento con mAb incubando las células con 10 $\mu\text{g/ml}$ de anticuerpo y tratando las células con 10 mg/kg de anticuerpo. Se usó el anticuerpo monoclonal CD28 como control. Análisis de bioluminiscencia de órganos aislados en el día 32 en pulmones e hígado; los dos sitios principales de metástasis. Este resultado es representativo de dos experimentos. Se obtuvieron resultados similares en ratones NSG pretratados dos días con 0,2 ml de liposomas de clodronato (reducción de macrófagos) (datos no mostrados).

Figura 5: Determinación de la CE50 de N41mab

10 A: Se midió la unión a la superficie celular de una dilución en serie de N41mab mediante análisis FACS en células SUM190 (negro). La comparación se realizó con el mAb anti-nectina4 Ha22-2 (blanco) (es decir, ASG-22ME).

B: Se realizó la unión de N41mab en VCC-Fc de nectina4 recombinante mediante ELISA (negro). La comparación se realizó con el mAb anti-nectina4 Ha22-2 (blanco) (es decir, ASG-22ME).

Figura 6: Interiorización de N41mab

15 La interiorización se realizó mediante el uso del epítipo marcado con FLAG de nectina4 expresado en células MDAMB231.

A: Expresión en la superficie celular de nectina4 mediante FACS. Las células se incubaron en primer lugar individualmente con los mAbs durante 24 h a 37 °C, y se monitorizó la expresión en la superficie celular mediante el uso de un anticuerpo anti-FLAG marcado con FITC (M2). Ilustración: Gris grueso: Ig de control, negro punteado: N42mab, negro grueso: N41mab. (N42mab es un mAb anti-nectina4 de control dirigido hacia el dominio IgV)

20 B: Comparación del porcentaje de interiorización inducido mediante los mAbs N42mab, N41mab y Ha22-2 realizado mediante FACS.

Figura 7: Caracterización del epítipo de N41mab

25 Se llevó a cabo un ensayo de competición con mAbs mediante ELISA. Se revistieron placas de noventa y seis pocillos con VCC-Fc de nectina4 durante la noche a +4 °C tal como se indica. La unión del N41mab conjugado con peroxidasa se midió en presencia de una concentración variable de mAbs N41mab, N42mab, N43mab y Ha22-2. N42mab y N43mab reconocen el dominio IgV de nectina4.

Figura 8: El tratamiento de ratones NSG injertados con SUM190 con N41mab-MMAE induce un periodo de tiempo de regresión tumoral de larga duración

30 A: Se sometió a ratones NSG a xenoinjertos ortotópicos de manera bilateral con las células SUM190 incrustadas en Matrigel. Esta línea de células tumorales de mama expresa una cantidad igual de HER2 y nectina4 en la superficie celular. Se ensayaron tres ADC diferentes: N41mab-vcMMAE, Ha22-2-vcMMAE y T-DM1.

35 El tratamiento de los ratones se inicia cuando los tumores alcanzan 200 mm³ (100%). En este periodo de tiempo, se administraron i.v. dos dosis de ADC-mabs (2,5 y 10 mg/kg) dos veces en el día 0 y el día 4 tras el injerto. Los tres ADC fueron activos y redujeron el desarrollo tumoral. N41mab-MMAE indujo el periodo de regresión de mayor duración a 2,5 y 10 mg/kg, respectivamente. B: Medidas de variación del peso en porcentaje según los tratamientos respectivos (10 mg/kg). No se observaron efectos adversos durante el experimento. C: Tiempo mediano para que los tumores alcancen 200 mm³ tras el tratamiento inicial.

Figura 9: Tratamiento de ratones NSG metastásicos con N41mab-MMAE

40 Se obtuvieron ratones NSG metastásicos mediante inyección i.v. de células SUM190 que expresaban luciferasa. Los ratones desarrollaron metástasis en diferentes sitios. Cuantificación de la luminiscencia mediante el uso de PhotonIMAGER (columna 1 = control; columna 2 = N41mab-vcMMAE-1; columna 3 = N41mab-vcMMAE-2).

En conjunto, estos datos apuntan a una notable actividad anti-tumoral de N4mab1-vcMMAE tanto en lesiones primarias como metastásicas.

Ejemplos:

45 EJEMPLO 1

Materiales y Métodos

Líneas celulares:

Se cultivó una línea celular de carcinoma de mama humano MDA-MB-231 (ATCC, Manassas, VA) a un 5% de CO₂ en DMEM complementado con un 10% de FBS (suero bovino fetal), 50 UI/ml de penicilina, 50 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina, y

glutamina 2 mM. Las células se transfectaron con el vector de expresión p3XFLR4.C1 que contenía un cADN de PVRL4 [x]. Las líneas de carcinoma de mama SUM-185, SUM-190 y SUM-225 fueron proporcionadas amablemente por el Dr S. P. Ethier (Universidad de Michigan). Se cultivaron en medio F12 de Ham con un 5% de FBS, aminoácidos no esenciales, 10 µg/ml de insulina, 1 µg/ml de hidrocortisona, 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina y glutamina 2 mM. La línea celular de carcinoma de mama BT-474 (ERBB2+) (ATCC) se cultivó en RPMI complementado con un 10% de FBS, 10 µg/ml de insulina, 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina, y glutamina 2 mM.

ELISA:

Se usó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de tipo sándwich para controlar la especificidad del anticuerpo N41mab y para llevar a cabo los ensayos de competición entre mAbs. Se revistieron placas de noventa y seis pocillos con 5 µg/ml de V-Fc de nectina4 o V-Fc de nectina1 (que comprendieron solamente el dominio de IgV) durante la noche a +4 °C. Después de los lavados y la saturación con PBS con un 1% de BSA las células se incubaron durante la noche con 0,625 µg/ml de N41mab. Se incubaron con anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con peroxidasa 2 h a 25 °C (Pierce). En el caso de la competición, se midió la unión de N41mab conjugado con peroxidasa en presencia de una concentración variable de mAb "frío". Se añadieron cien µl de sustrato de peroxidasa (One Step ABST, Pierce), y se leyó la DO a 405 nm.

Citometría de flujo:

Análisis FACS de la línea celular MDAMB231 transfectada con el epítipo marcado con FLAG N-terminal de Nectina4 mediante el uso de 2 µg/ml de anticuerpo N41mab. Las células se tiñeron después con anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con ficoeritrina (Beckman-Coulter).

Análisis de inmunotransferencia:

Experimentos de inmunotransferencia: análisis de lisados celulares de células MDAMB231-nectina4. Se lavaron las células en placas de 100 mm 3 veces con PBS helado y después se resuspendieron durante 30 min en 750 µl de tampón de lisis helado que contuvo Hepes 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, 1% de Triton X-100, y 10% de glicerol. Se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas como recomendó el fabricante (Roche Diagnostics). Los lisados se calentaron en tampón de muestra con SDS (Tris-HCl 60 mM, pH 6,7, 3% de SDS, 2% (v/v) de 2-mercaptoetanol, y 5% de glicerol), se separaron mediante SDS-PAGE del 8%, se transfirieron semisecos a membranas de poli(difluoruro de vinilideno) (Immobilon-P, Millipore, Boston, MA), se sondearon con 1 µg/ml de MOPC21, anti-FLAG M2, y N41mab, mediante el uso del aparato Mini-Protean II Multiscreen. La visualización se realizó con ECL (Pierce).

Producción de conjugado anticuerpo-fármaco (ADC):

Brevemente, el conjugado se ha producido a partir de los anticuerpos monoclonales N41mab y Ha22-2 purificados. El ligador usado es el MC-Val-Cit-PAB-PNP (Maleimidocaproil-L-valina-L-citrulina-alcohol p-aminobencílico-carbonato de p-nitrofenilo) conjugado de manera covalente a monometil auristatina-E (MMAE). La proporción de fármaco respecto del anticuerpo fue 4,73 y 4,04, respectivamente.

Medida del crecimiento/viabilidad celular:

Para analizar el efecto del ADC, se midió el crecimiento celular mediante el uso del procedimiento de tinción alamarBlue como recomendó el fabricante (Biosource, CA, EE.UU.). El ensayo incorpora un indicador de oxidación-reducción fluorescente. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la reducción metabólica celular. Los experimentos se realizaron incubando 3000 células/pocillo por triplicado con diluciones en serie de ADC en el Día 0 en placas de 96 pocillos. Se midió alamarBlue en el Día 5 incubando con 1/10 del volumen de disolución de alamarBlue durante 2 h a 37 °C, y se leyó a 595 nm (FLUOstar Optima, BMG Labtech).

Ensayo de invasión:

El ensayo de invasión se llevó a cabo mediante el uso de los insertos de cultivo celular de 24 pocillos con una membrana de tamaño de poro de 8 mm revestidos con Matrigel (cámara de invasión con Matrigel, reducida en factores de crecimiento BD BioCoat (Becton Dickinson, MA, EE.UU.)). Se añadió el agente quimioatrayente (10% de FCS) a los pocillos y se cargaron 10⁵ células en el inserto en RPMI con un 0,1% de BSA. Las placas se incubaron durante 72 h a 37 °C. Tras la migración, las células que no migraron de la superficie de la membrana superior se eliminaron con torundas con puntas de algodón (cuatro veces por inserto), y las células migratorias unidas a la superficie inferior de la membrana se tiñeron durante 20 min con violeta cristal al 0,2% en etanol (Sigma). Después de cinco lavados con 200 ml de agua destilada, se contaron las células invasivas con un microscopio invertido. Cada determinación representa la media de tres experimentos individuales realizados por duplicado.

Experimentos en ratones:

Se obtuvieron ratones NOD/SCID (diabéticos no obesos/inmunodeficiencia grave combinada)/nulos para γ c (NSG) de

Charles River Laboratory (Margate, R.U.).

5 Se trasplantaron células que expresaban luciferasa a los ratones, de manera subcutánea o en la vena caudal o en las almohadillas de grasa mamarias (hembra de 7 semanas de edad). El tratamiento con N41mab o ADC se llevó a cabo como se menciona en los experimentos respectivos. El análisis de bioluminiscencia se llevó a cabo mediante el uso de un aparato PhotonIMAGER (BiospaceLab), tras la inyección intraperitoneal de luciferina (30 mg/kg). El volumen tumoral se calculó mediante el uso de la fórmula $V \frac{1}{4} 0:52 (LxW^2)$. Tras la finalización del análisis, se realizó una autopsia a los ratones y se estudió la luminiscencia de los órganos.

Resultados

Los resultados se representan en las Figuras 1-9.

10 EJEMPLO 2:

Materiales y Métodos

Pacientes y muestras de cáncer de mama. Declaración ética.

15 Se había realizado el perfil de las muestras clínicas mediante el uso de micromatrices de ADN para los análisis de expresión génica. El conjunto de datos incluyó 353 casos que representaron carcinomas invasivos en pretratamiento de pacientes no metastásicos en el momento del diagnóstico. El estudio fue aprobado por el comité de revisión institucional (Instituto Paoli Calmettes (IPC) "Comité de Orientación Estratégica", acuerdo nº 15-002). Cada paciente proporcionó un consentimiento informado por escrito para el uso en investigación. Se mezcló esta serie con 17 conjuntos de datos disponibles que comprendieron al menos un grupo de sondas que representaron PVRL4. Estos grupos se recogieron de las bases de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI)/Genbank GEO y ArrayExpress, y del sitio de Internet de los autores (datos no mostrados). El conjunto de datos mezclado final incluyó 5.673 cánceres de mama invasivos primarios, no inflamatorios, no metastásicos y no redundantes, con expresión de mRNA de PVRL4 y datos clinicopatológicos disponibles (datos no mostrados). Para la expresión de proteínas, se obtuvo un análisis de un panel consecutivo de 61 muestras de TNBC en el momento del diagnóstico y antes de la terapia sistémica de las mujeres tratadas en el Instituto. Se obtuvo el consentimiento informado para la incorporación al estudio para cada paciente, y el estudio fue aprobado por parte del comité de revisión institucional (datos no mostrados).

Análisis de los datos de expresión génica

30 Se había generado un conjunto de datos propio de expresión génica mediante el uso de micromatrices humanas Affymetrix U133 Plus 2.0 (Affymetrix®, Santa Clara, CA, EE.UU.) como se describió previamente (21). Los datos conforme a la norma MIAME están depositados en la base de datos GEO (GSE31448). Se midió la expresión de PVRL4 analizando diferentes grupos de sondas cuya identidad y especificidad se verificó mediante el uso del programa del NCBI BLASTN 2.2.31+ (datos no mostrados). El análisis de los datos requirió un procesamiento pre-analítico. Primero, cada conjunto de datos se normalizó por separado, mediante el uso de una normalización por cuantiles para los datos no pertenecientes a Affymetrix procesados disponibles (Agilent, SweGene, Illumina), y Robust Multichip Average (RMA) (22) con el algoritmo de cuantil no paramétrico para los datos de Affymetrix en bruto. La normalización se realizó en R mediante el uso de Bioconductor y paquetes asociados. En la segunda etapa, las sondas de hibridación se cartografiaron en las diferentes plataformas tecnológicas representadas, mediante el uso de sus EntrezGeneID. Cuando se cartografiaron múltiples sondas en el mismo GeneID, se conservó la que tuvo la varianza más alta en un conjunto de datos particular. Para evitar sesgos relacionados con los análisis de inmunohistoquímica entre los diferentes conjuntos de datos y gracias a la distribución bimodal de los niveles de expresión de mRNA correspondientes, la expresión del receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), y HER2 (negativo/positivo) se definió a nivel transcripcional mediante el uso de los datos de expresión de mRNA de ESR1, PGR, y ERBB2, respectivamente (23). Después se aplicaron diferentes clasificadores multigénicos a cada conjunto de datos por separado. Los subtipos moleculares intrínsecos de los tumores se definieron mediante el uso de los niveles de expresión de mRNA de ESR1, PGR, y ERBB2 (HR+ para tumores ESR1+ y/o PGR+ y ERBB2-; ERBB2+ para tumores ERBB2+, y TN para tumores ESR1-, PGR- y ERBB2-) y mediante el uso del clasificador PAM50 (24). Debido a la presencia de PVRL4 en el agrupamiento génico basal, también se analizaron tres distintivos pronósticos de la expresión génica (GES) asociados a la respuesta inmunitaria y validados en cánceres de mama ER-, TN o basales: el "GES de la respuesta inmunitaria" (25), el "GES LCK" (26), y el "GES inmunitario de quinasa" (27). Antes del análisis de la expresión de mRNA de PVRL4, los datos de expresión se estandarizaron en cada conjunto de datos mediante el uso de la población luminal A como referencia, lo que permitió excluir los sesgos debidos a las variaciones específicas del laboratorio y a la heterogeneidad de la población, y hacer que todos los conjuntos de datos fueran comparables. Como se informó previamente (28), el análisis de componentes principales (PCA) aplicado a todos los tumores y los genes PAM50 antes y después de la estandarización permitió verificar la exactitud de la normalización.

55 Producción y selección de anticuerpos monoclonales anti-nectina-4

Se produjeron y se analizaron seis anticuerpos monoclonales diferentes dirigidos hacia el dominio similar a IgV distal de nectina-4 (mab1 a mab6). Se usó la proteína V-Fc de nectina4 quimérica soluble recombinante para inmunizar a

los ratones (6). El cribado del anticuerpo derivado de hibridomas hacia nectina-4 se realizó mediante citometría de flujo con el uso de células MDA-MB-231 transfectadas y ELISA.

Inmunohistoquímica (IHC)

5 La IHC se llevó a cabo con cortes de 5 µm de tejido congelado. Los cortes se fijaron en acetona durante 10 min, se secaron al aire durante 10 min y se rehidrataron en TBST. La tinción se realizó con 0,5 µg/ml de mab1/N41mab durante 3 h a 37 °C. Se incubó el anticuerpo secundario OmnipMap anti-Ms HRP (Multimer HRP, Roche) durante 15 min. Después se realizó la tinción de contraste con Hematoxilina II y reactivo azulador (Roche). Los resultados se puntuaron (puntuación Quick) multiplicando el porcentaje de células positivas (P) por la intensidad (I). Fórmula: QS = P x I. La puntuación máxima es 300.

10 Líneas celulares

Se cultivó una línea celular de carcinoma de mama humano MDA-MB-231 (ATCC, Manassas, VA) a un 5% de CO2 en DMEM complementado con un 10% de FBS (suero bovino fetal), 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, y glutamina 2 mM. Las células se transfectaron con el vector de expresión p3XFLR4.C1 que contenía un cADN de PVRL4 (7). La línea de carcinoma de mama SUM190 fue proporcionada amablemente por el Dr S. P. Ethier (Universidad de Michigan) y se cultivó en medio F12 de Ham con un 5% de FBS, aminoácidos no esenciales, 10 µg/ml de insulina, 1 µg/ml de hidrocortisona, 50 UI/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina y glutamina 2 mM.

Producción de ADC

20 La producción de ADC la llevó a cabo ConcorTis (San Diego, CA, EE.UU.). Los conjugados se produjeron a partir del anticuerpo monoclonal mab1/N41mab purificado. El ligador usado fue el MC-Val-Cit-PAB-PNP (Maleimidocaproil-L-valina-L-citulina-alcohol p-aminobencílico-carbonato de p-nitrofenilo) conjugado de manera covalente a monometil auristatina-E (MMAE). Se seleccionó este ligador escindible, ya que indujo una potente destrucción por cercanía. La proporción de fármaco respecto del anticuerpo fue 4,73.

ELISA

25 Se usó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de tipo sándwich para controlar la especificidad del anticuerpo N41mab. Se revistieron placas de noventa y seis pocillos con 5 µg/ml de V-Fc de nectina4 o V-Fc de nectina1 (que comprendieron solamente el dominio de IgV) durante la noche a +4 °C. Después de lavados y saturación con PBS con un 1% de BSA las células se incubaron durante la noche con 0,625 µg/ml de mab1/N41mab. El anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado a peroxidasa se incubó 2 h a 25 °C (Pierce). Se añadieron cien µl de sustrato de peroxidasa (One Step ABST, Pierce), y se leyó la DO a 405 nm.

30 Citometría de flujo

El análisis FACS de las células MDA-MB-231 transfectadas con el epítipo marcado con FLAG N-terminal de Nectina4 se realizó mediante el uso de 2 µg/ml de anticuerpo mab1/N41mab. Las células se tiñeron después con anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con ficoeritrina (Beckman-Coulter).

Análisis de inmunotransferencia

35 Se analizó la expresión de Nectina-4 en células que expresaban Nectina-4 MDA-MB-231 en placas de 100 mm, se lavaron 3 veces con PBS helado y después se resuspendieron durante 30 min en 750 µl de tampón de lisis helado que contuvo Hepes 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EGTA 1 mM, 1% de Triton X-100, y 10% de glicerol. Se añadió una mezcla de inhibidores de proteasas como se recomendó (Roche Diagnostics). Los lisados se calentaron en tampón de muestra con SDS (Tris-HCl 60 mM, pH 6,7, 3% de SDS, 2% (v/v) de 2-mercaptoetanol, y 5% de glicerol), se separaron mediante SDS-PAGE del 8%, se transfirieron semisecos a membranas de poli(difluoruro de vinilideno) (Immobilon-P, Millipore, Boston, MA, EE.UU.), se sondearon con 1 µg/ml de MOPC21, anti-FLAG M2, y mab1/N41mab, mediante el uso del aparato Mini-Protean II Multiscreen. La visualización se realizó con ECL (Pierce).

Medida del crecimiento/viabilidad celular

45 Para analizar el efecto del ADC, se midió el crecimiento celular mediante el uso del procedimiento de tinción alamarBlue como recomendó el fabricante (Biosource, CA, EE.UU.). El ensayo incorpora un indicador de oxidación-reducción fluorescente. La intensidad de la fluorescencia es proporcional a la reducción metabólica celular. Los experimentos se realizaron incubando 3000 células/pocillo por triplicado con diluciones en serie de ADC en el Día 0 en placas de 96 pocillos. Se midió alamarBlue en el día 5 incubando con 1/10 del volumen de disolución de alamarBlue durante 2 h a 37 °C, y se leyó a 595 nm (FLUOstar Optima, BMG Labtech).

50 Modelos animales

Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con las Directrices Francesas para la manipulación de animales, y fueron aprobadas por el comité de ética local (acuerdo n° 01152-01). Los ratones NOD/SCID/nulos para γ c (NSG) se obtuvieron del Dr. C. Rivers (Margate, R.U.). Los ratones se albergaron en condiciones estériles con agua y

alimentos esterilizados proporcionados a voluntad, y se mantuvieron con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Se inocularon células SUM190 en la almohadilla de grasa mamaria ($0,5 \times 10^6$) suspendidas en Matrigel sin rojo fenol del 50% (Becton Dickinson Bioscience). Las células tumorales derivadas del paciente (modelos PDX) se inocularon en la almohadilla de grasa mamaria ($0,2$ a $0,5 \times 10^6$) suspendidas en Matrigel sin rojo fenol del 50%.

5 Se monitorizó el crecimiento tumoral midiendo con un calibre digital y calculando el volumen tumoral ($\text{longitud} \times \text{anchura}^2 \times \pi/6$). Todos los animales se asignaron de manera aleatoria en grupos de tratamiento, de forma que el volumen tumoral medio para cada grupo fue de 100 a 200 mm^3 . El tratamiento con ADC se llevó a cabo como se menciona en los experimentos respectivos. Se inocularon células SUM190 que expresaban luciferasa ($0,5 \times 10^6$ células en 100 μL de PBS) en la vena de la cola de los ratones NSG. Se llevó a cabo un análisis de bioluminiscencia
10 mediante el uso de un aparato PhotonIMAGER (Biospace Lab) tras la adición de luciferina exenta de endotoxina (30 mg/kg). Tras la finalización del análisis, se realizó una autopsia a los ratones, y se estudió la luminiscencia de los órganos. De entre una colección de PDX desarrollados en los ratones NSG y previamente caracterizados en CRCM (16), se seleccionaron 9 modelos de PDX de tipo basal (obtenidos de TNBCs primarios) para los estudios de IHC. Se trataron cuatro PDX con ADC como se mencionó en los experimentos respectivos.

15 Métodos estadísticos

Se analizaron las correlaciones entre los grupos de tumores y las características clinicopatológicas mediante el uso de la prueba exacta de Fisher. Se calculó la supervivencia sin metástasis (MFS) desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de recidiva distante. El seguimiento se midió desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de últimas noticias para los pacientes que no tuvieron ningún evento. Las supervivencias se calcularon mediante el uso del método de Kaplan-Meier, y las curvas se compararon con la prueba de rango logarítmico. Los análisis univariantes y multivariantes de la supervivencia se realizaron mediante el uso del análisis de regresión de Cox (prueba de Wald). Las variables ensayadas en los análisis univariantes incluyeron la edad de los pacientes en el momento del diagnóstico (≤ 50 años frente a >50), el tipo patológico (ductal frente a no ductal), el tamaño del tumor patológico (pT: pT1 vs pT2-3), el estado de los nódulos linfáticos axilares patológicos (pN: negativo frente a positivo), grado patológico (1-2 frente a 3), y expresión de PVRL4 ("alta" frente a "baja"). Las variables con un valor $p < 0,05$ en el análisis univariante se analizaron en el análisis multivariante. Todos los ensayos estadísticos fueron bilaterales a un nivel de significación del 5%. El análisis estadístico se realizó mediante el uso del paquete de supervivencia (versión 2.30) del programa informático R (versión 2.9.1; <http://www.cran.r-project.org/>). Se siguieron las recomendaciones de informe para estudios pronósticos de marcadores tumorales (criterios REMARK). Los datos se presentan como la media + e.e.m. y se calcularon mediante una prueba de Mann-Whitney mediante el uso del programa informático GraphPad Prism. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Los datos son representativos de al menos tres experimentos.

Resultados:

La nectina4/PVRL4 es un biomarcador específico de TNBC

Se examinó la expresión de mRNA de PVRL4 en una serie mezclada de 5673 cánceres de mama invasivos en los que se había realizado el perfil mediante el uso de micromatrices de ADN y cinco sondas para PVRL4 diferentes 100% específicas (véase la sección materiales y métodos). El agrupamiento en todo el genoma de la serie de 353 muestras mostró que PVRL4 estuvo en el agrupamiento génico "basal" (datos no mostrados). La expresión elevada de PVRL4 estuvo asociada con características de mal pronóstico, que incluyeron tanto el subtipo triple negativo (TN) como el subtipo basal PAM50 (datos no mostrados). Los datos de supervivencia sin metástasis (MFS) estuvieron disponibles para 1.037 pacientes, que incluyeron 613 sin recidiva metastásica (seguimiento mediano, 83 meses) y 424 con recidiva metastásica (tiempo mediano hasta la recidiva, 24 meses). La tasa de MFS de 5 años fue del 61% (95CI, 0,58-0,65). En la población total, la expresión elevada de PVRL4 estuvo asociada a una MFS más corta ($p=0,0143$, prueba de rango logarítmico), (datos no mostrados). La expresión elevada de PVRL4 estuvo asociada realmente con una MFS en el subgrupo TN solamente, con una MFS de 5 años del 47% (95CI, 0,40-0,55) frente al 62% (95CI, 0,51-0,74) en los grupos "PVRL4 alto" y "PVRL4 bajo", respectivamente ($p=0,014$, prueba de rango logarítmico), (Figura 1c) y la expresión de PVRL4 conservó un impacto pronóstico ($p=0,036$, prueba de Wald; HR=1,53 [1,02-2,30]) en el análisis multivariante (Tabla 1). A continuación se examinó la expresión de nectina-4 a nivel de proteínas mediante inmunohistoquímica en 61 TNBCs, 12 de ellos con perfiles realizados previamente mediante el uso de micromatrices de ADN. El anticuerpo monoclonal usado para este análisis, seleccionado del ensayo de cribado (véase el párrafo siguiente), reconoció el dominio similar a IgV distal de la nectina-4 humana y no reaccionó de manera cruzada con las otras nectinas humanas o con la nectina-4 de ratón (datos no mostrados). Basándose en la determinación semicuantitativa QuickScore (QS), se distinguió un "grupo de nectina-4 alta" con un QS >100 y un "grupo de nectina-4 baja" con un QS <100 , que representan un 62% y 38% de TNBCs, respectivamente (datos no mostrados). La expresión de nectina-4 se detectó en la membrana plasmática. El mRNA y la expresión de proteínas de nectina-4 mostraron una buena correlación (datos no mostrados; $p=0,0022$). De manera importante, no se detectó nectina-4 ni en el epitelio de las glándulas mamarias normales (datos no mostrados) ni en 30 tejidos normales adultos diferentes, excepto en la piel (datos no mostrados). Estos resultados establecieron que la nectina-4 es tanto un nuevo biomarcador de la superficie celular como un objetivo potencial para los TNBCs.

Selección como objetivo basada en ADC de nectina-4 in vitro

Se produjeron y se ensayaron seis anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos hacia el dominio distal similar a IgV de nectina-4 para aislar un mAb capaz de inducir la interiorización. Se determinó la CE50, la capacidad de unión máxima, la interiorización de la superficie celular y la citotoxicidad de los mAbs (datos no mostrados). La interiorización se ensayó mediante el uso de nectina-4 marcada con FLAG expresada en células MDA-MB-231 y anticuerpo anti-FLAG marcado con FITC (M2, Sigma-Aldrich) para cuantificar la nectina-4 superficial residual. El Mab1 fue el anticuerpo más eficaz. Indujo un 60% de disminución de nectina-4 de la superficie celular en 24 h y un 60% de inhibición del crecimiento celular tras la incubación con un anticuerpo monoclonal anti-ratón de cabra conjugado a saporina (kit mab-ZAP, ATSBio). La interiorización y la citotoxicidad se correlacionaron ($R^2=0,9606$). El mab1 no afectó a la viabilidad celular in vitro y al crecimiento de células tumorales in vivo (datos no mostrados). Mab1 se conjugó después a monometil auristatina-E (MMAE) por medio de un ligador di-peptídico de valina-citrulina (vc) escindible (a continuación denominado N41mab-vcMMAE, ADC) para producir un ADC, que se ensayó in vitro con respecto a su especificidad y eficacia sobre líneas celulares seleccionadas de cáncer de mama. Las células MDA-MB-231, que expresan nectina-1, nectina-2, y nectina-3, pero no nectina-4, no fueron sensibles al ADC. Sin embargo, la expresión ectópica de nectina-4 confirió sensibilidad, con una CI50 = 2 ng/ml (datos no mostrados). Las células SUM190, que expresan nectina-4 endógena, fueron sensibles con una CI50 = 4 ng/ml (datos no mostrados). Estos datos demostraron la especificidad y la eficacia de N41mab-vcMMAE.

Selección como objetivo basada en ADC de nectina-4 in vivo

La actividad del ADC se ensayó en tres modelos in vivo de TNBC desarrollados en ratones NSG inmunodeprimidos. En primer lugar, los ratones a los que se realizó un xenoinjerto de células SUM190 se trataron con dos dosis i.v. sucesivas de N41mab-vcMMAE (datos no mostrados). Estas dosis no fueron tóxicas para los ratones (datos no mostrados). N41mab-vcMMAE indujo una regresión tumoral rápida (4 días) y dependiente de la dosis que duró hasta 40 días (datos no mostrados). Tras la recidiva, los tumores todavía mantuvieron su sensibilidad al ADC, al menos a lo largo de un periodo de 6 meses (datos no mostrados).

En segundo lugar, se usaron xenoinjertos derivados de pacientes (PDX) de TNBC primarios. Estos modelos preclínicos resumen la fisiopatología del cáncer de mama (16). La localización y los niveles de expresión de nectina-4 en los PDX fueron similares a los hallados en los pacientes de TNBC (datos no mostrados). La expresión de nectina-4 se halló de manera prominente en la membrana plasmática en 7/9 PDX (QS>100). Los ratones con PDX de TNBC con diferentes QS se trataron con dos dosis i.v. sucesivas de ADC. La respuesta clínica se correlacionó aproximadamente con el nivel de expresión: se observó una regresión rápida y notable de la masa tumoral (hasta 35 días) para PDX400 (QS=300), PDX 317 (QS=140), en menor grado para PDX348 (QS=100) (datos no mostrados), pero no para PDX434 (QS=10) (datos no mostrados). En contraste, el tratamiento de PDX 348 mediante docetaxel (3 veces 10 mg/kg i.p.) fue ineficaz (datos no mostrados).

En tercer lugar, para determinar la eficacia del tratamiento con ADC en una enfermedad avanzada, se trató a ratones PDX317 y PDX400 que desarrollaron lesiones metastásicas espontáneas a partir de tumores primarios. El tratamiento de los dos PDX con dos dosis i.v. sucesivas de ADC condujo a una reducción rápida y a la desaparición de todas las lesiones metastásicas observadas mediante un análisis de luminiscencia a lo largo de 35 días (datos no mostrados). Se detectaron recidivas por metástasis en el día 28 y 43 tras el tratamiento con ADC para PDX400, y todavía no se observaron para PDX317 tras 112 días. Estos resultados mostraron que N41mab1-vcMMAE tuvo una actividad antitumoral notable tanto en TNBCs primarios como metastásicos que expresaban nectina-4.

40

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Inserm
- <120> Anticuerpos que tienen especificidad hacia nectina-4 y usos de los mismos
- 5 <130> BIO15365 LOPEZ / MC
- <160> 4
- 10 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 116
- <212> PRT
- 15 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> secuencia VH
- 20 <400> 1
- Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
- Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30
- Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
- Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile
50 55 60
- Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80
- Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
- Arg Glu Leu Ile His Ala Met Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
100 105 110
- Thr Val Ser Ser
115
- <210> 2
- <211> 106
- 25 <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> secuencia VL
- 30 <400> 2

ES 2 794 557 T3

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30

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

Phe Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 3
 <211> 348
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de cadena pesada de ADN

10 <400> 3
 cagggtgcagc tgaagcagtc aggacctggc ctagtgcagc cctcacagag cctgtccatc 60
 acctgcacag tctctggttt ctacttact aactatgggtg tacactgggt tcgccagtct 120
 ccagaaagg gtctggagtg gctgggagtg atatggagtg gtggtagcac agactataat 180
 gcagctttca tatccagact gagcatcagc aaggacacct ccaagagcca agttttcttt 240
 aaaatgaaca gtctgcaagc tgatgacaca gccatatact actgtgccag agagttaatc 300
 catgctatgg acaactgggg ccaaggaacc tcagtcaccg tctcctca 348

<210> 4
 15 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Secuencia de cadena ligera de ADN

20 <400> 4
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 60
 atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacag 120
 ggaaactctc ctccagctcct ggtctttgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca 180
 aggttcagtg gcagtgatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct 240
 gaagattttg ggacttatta ctgtcaacat ttttggggta ctccgacgtt cgggtggaggc 300
 accaagctgg aaatcaaa 318

25

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que tiene especificidad hacia nectina-4 y que tiene
 - una cadena pesada que comprende i) una H-CDR1 que tiene al menos un 90% de identidad con la H-CDR1 de N41mab, ii) una H-CDR2 que tiene al menos un 90% de identidad con la H-CDR2 de N41mab y iii) una H-CDR3 que tiene al menos un 90% de identidad con la H-CDR3 de N41mab y
 - una cadena ligera que comprende i) una L-CDR1 que tiene al menos un 90% de identidad con la L-CDR1 de N41mab, ii) una L-CDR2 que tiene al menos un 90% de identidad con la L-CDR2 de N41mab y iii) una L-CDR3 que tiene al menos un 90% de identidad con la L-CDR3 de N41mab
 en el que
 - la H-CDR1 de N41mab se define mediante la secuencia abarcada desde el residuo de aminoácido de la posición 31 hasta el residuo de aminoácido de la posición 35 en SEQ ID N°:1,
 - la H-CDR2 de N41mab se define mediante la secuencia abarcada desde el residuo de aminoácido de la posición 50 hasta el residuo de aminoácido de la posición 65 en SEQ ID N°:1,
 - la H-CDR3 de N41mab se define mediante la secuencia abarcada desde el residuo de aminoácido de la posición 98 hasta el residuo de aminoácido de la posición 105 en SEQ ID N°:1,
 - la L-CDR1 de N41mab se define mediante la secuencia abarcada desde el residuo de aminoácido de la posición 24 hasta el residuo de aminoácido de la posición 34 en SEQ ID N°:2,
 - la L-CDR2 de N41mab se define mediante la secuencia abarcada desde el residuo de aminoácido de la posición 50 hasta el residuo de aminoácido de la posición 56 en SEQ ID N°:2, y
 - la L-CDR3 de N41mab se define mediante la secuencia abarcada desde el residuo de aminoácido de la posición 89 hasta el residuo de aminoácido de la posición 96 en SEQ ID N°:2.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1 que tiene una cadena pesada que comprende i) la H-CDR1 de N41mab, ii) la H-CDR2 de N41mab y iii) la H-CDR3 de N41mab, y una cadena ligera que comprende i) la L-CDR1 de N41mab, ii) la L-CDR2 de N41mab y iii) la L-CDR3 de N41mab.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 que tiene una cadena pesada idéntica a SEQ ID N°:1 y una cadena ligera idéntica a SEQ ID N°:2.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1 que es un anticuerpo quimérico.
5. El anticuerpo de la reivindicación 1 que es un anticuerpo humanizado que comprende las CDRs del anticuerpo N41mab.
6. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo de la reivindicación 1.
7. El anticuerpo de la reivindicación 1 que está conjugado a un resto citotóxico.
8. El anticuerpo de la reivindicación 7 que está conjugado a un resto citotóxico seleccionado del grupo que consiste en taxol; citocalasina B; gramicidina D; bromuro de etidio; emetina; mitomicina; etopósido; tenopósido; vincristina; vinblastina; colchicina; doxorubicina; daunorrubicina; dihidroxi antracina diona; un inhibidor de tubulina tal como maitansina o un análogo o derivado de la misma; Mertansina o un análogo, derivado o profármaco peptídico de la misma; un agente antimetabólico tal como monometil auristatina E o F o un análogo o derivado de la misma; dolastatina 10 o 15 o un análogo de la misma; irinotecano o un análogo del mismo; mitoxantrona; mitramicina; actinomicina D; 1-deshidrotestosterona; un glucocorticoide; procaína; tetracaína; lidocaína; propranolol; puromicina; caliqueamicina o un análogo o derivado de la misma; un antimetabolito tal como metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo, decarbazina, hidroxiurea, asparaginasa, gemcitabina, o cladribina; un agente alquilante tal como mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU), lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptoizotocina, dacarbazina (DTIC), procarbazona, mitomicina C; un derivado de platino tal como cisplatino o carboplatino; duocarmicina A, duocarmicina SA, rachelmicina (CC-1065), o un análogo o derivado de las mismas; un antibiótico tal como dactinomicina, bleomicina, daunorrubicina, doxorubicina, idarrubicina, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, antramicina (AMC); pirrolo[2,1-c][1,4]-benzodiazepinas (PDB); toxina de la difteria y moléculas relacionadas, tales como cadena A de la difteria y fragmentos activos de la misma y moléculas híbridas, toxina de ricina tal como ricina A o una toxina de la cadena A desglucosilada de la ricina, toxina del cólera, una toxina de tipo Shiga tal como SLT I, SLT II, SLT IIV, toxina LT, toxina C3, toxina Shiga, toxina de la tos ferina, toxina del tétanos, inhibidor de proteasas de tipo Bowman-Birk de soja, exotoxina de Pseudomonas, alorina, saporina, modeccina, gelanina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de Aleurites fordii, proteínas de diantina, proteínas de Phytolacca americana tales como PAPI, PAPII, y PAP-S, inhibidor de Momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de Sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, y toxinas

de enomicina; ribonucleasa (RNasa); DNasa I, enterotoxina A estafilocócica; proteína antiviral de *Phytolacca americana*; toxina de la difteria; y endotoxina de *Pseudomonas*.

9. El anticuerpo de las reivindicaciones 7 o 8 que está conjugado a una auristatina o un análogo, derivado o profármaco peptídico de la misma.
- 5 10. El anticuerpo de la reivindicación 1 para el uso como un medicamento.
11. El anticuerpo de la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento del cáncer.
12. El anticuerpo de la reivindicación 1 para el uso según la reivindicación 11, en el que el cáncer es un cáncer de mama, un cáncer ovárico o un cáncer de pulmón.
13. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1.
- 10 14. Un receptor de antígeno quimérico que comprende la secuencia VH y VL del anticuerpo de la reivindicación 1.

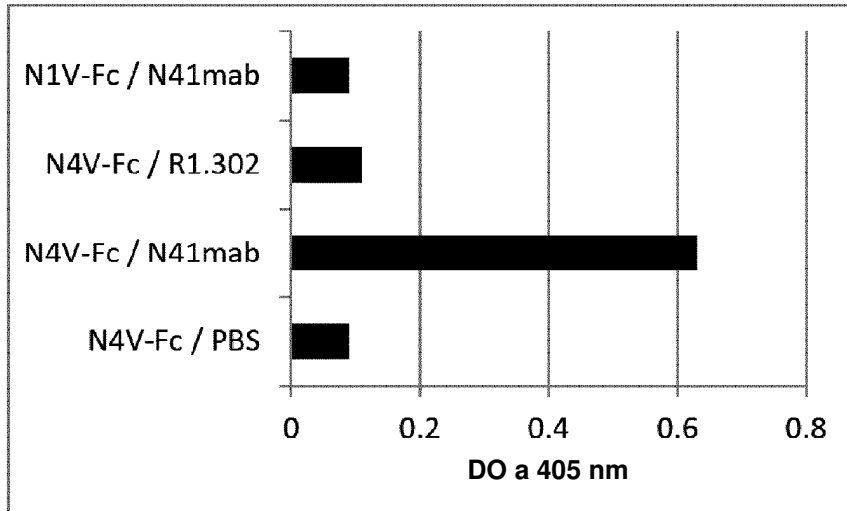


Figura 1A

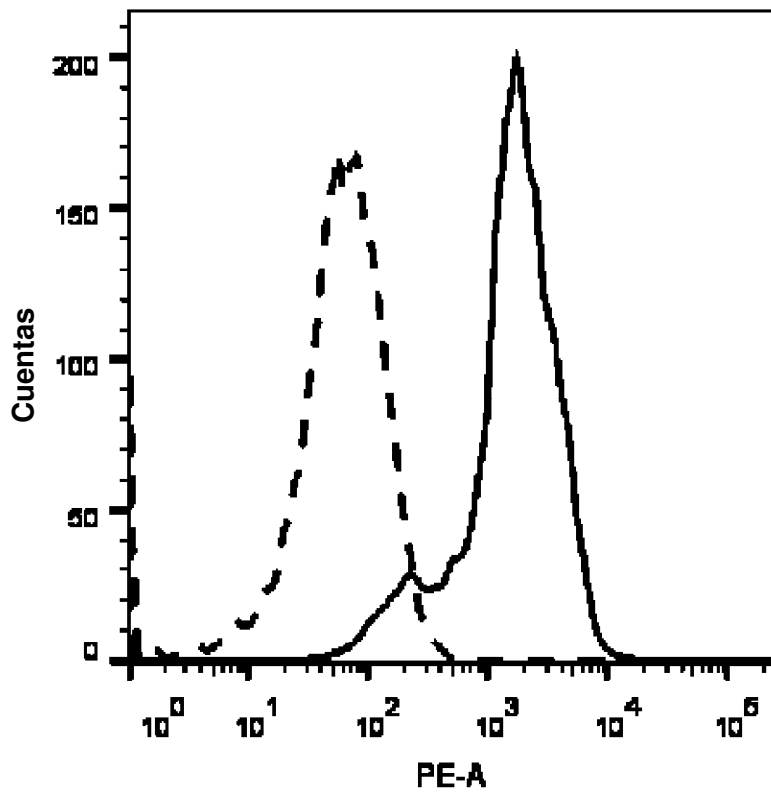
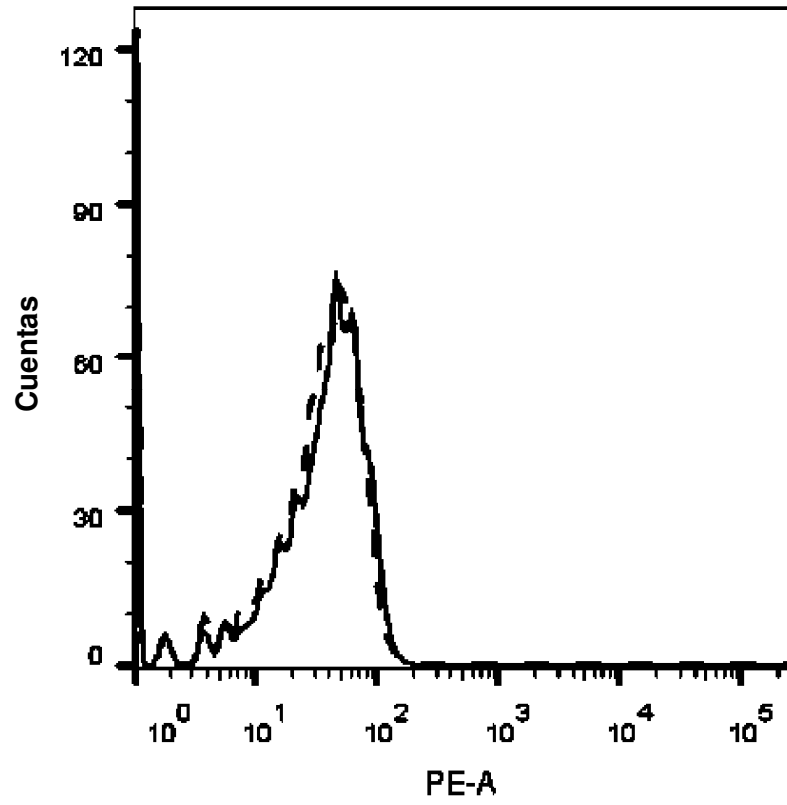


Figura 1B

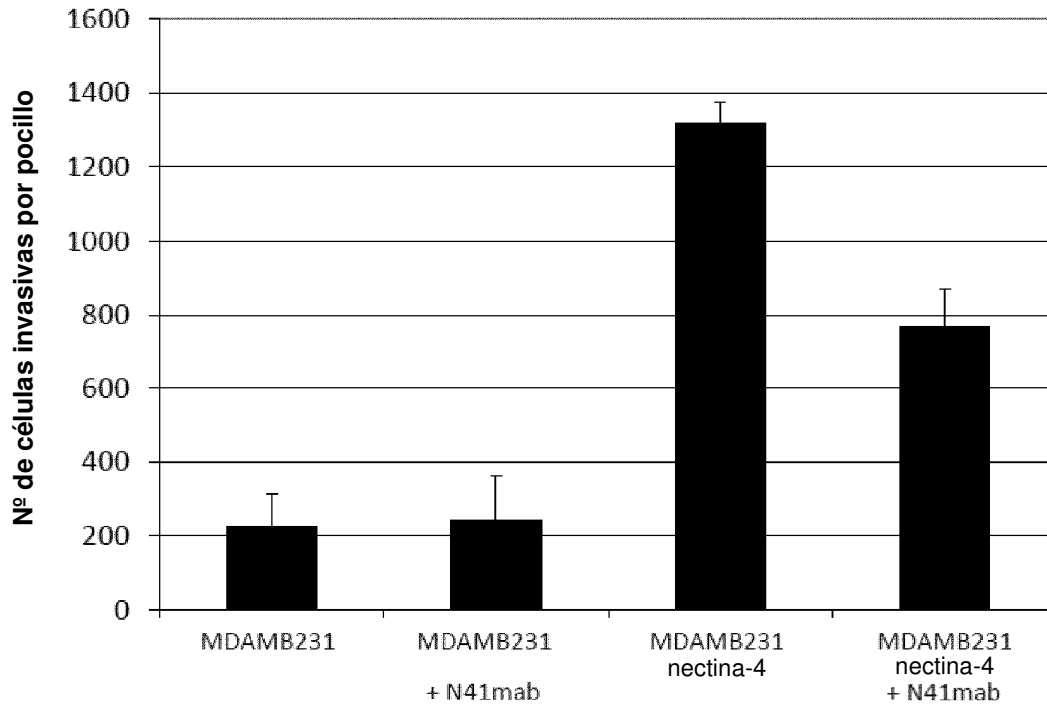


Figura 2

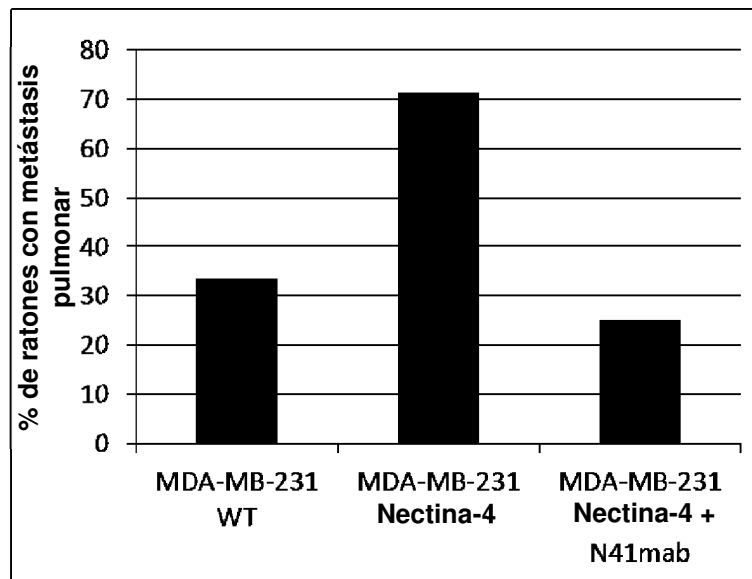


Figura 3

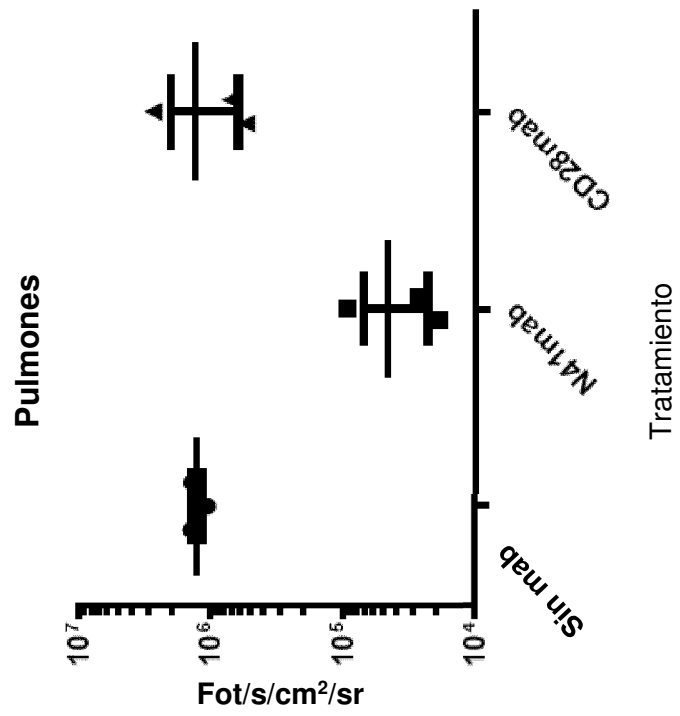
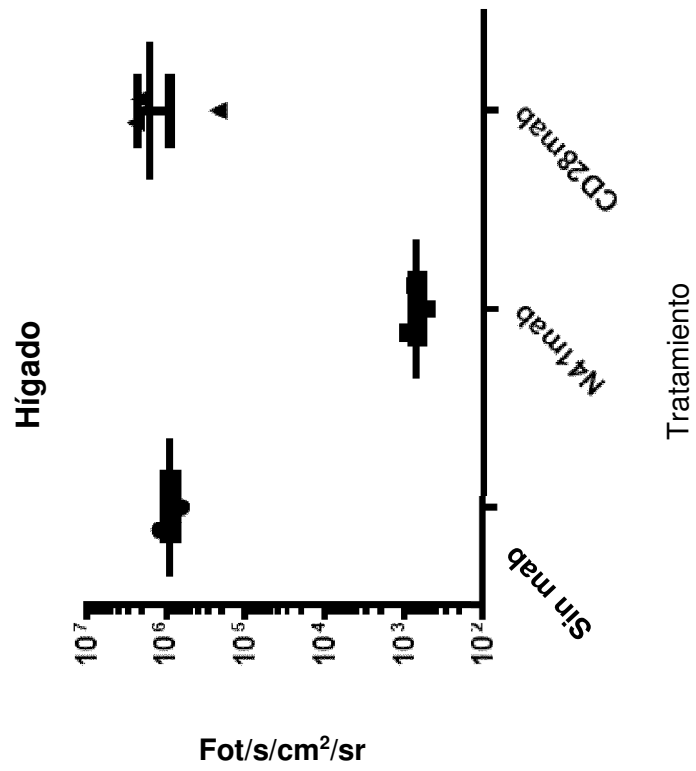
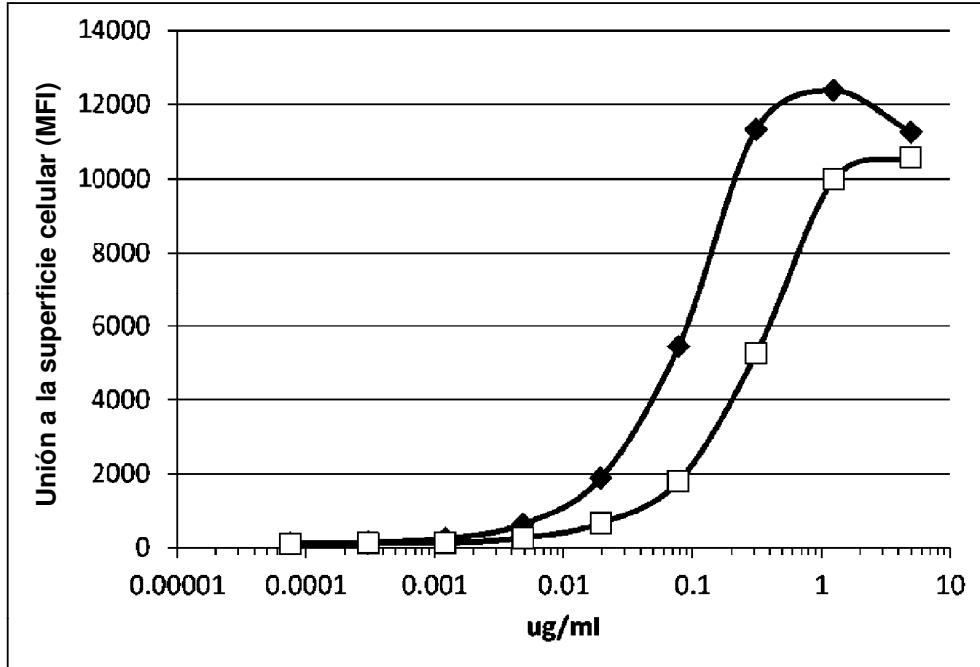
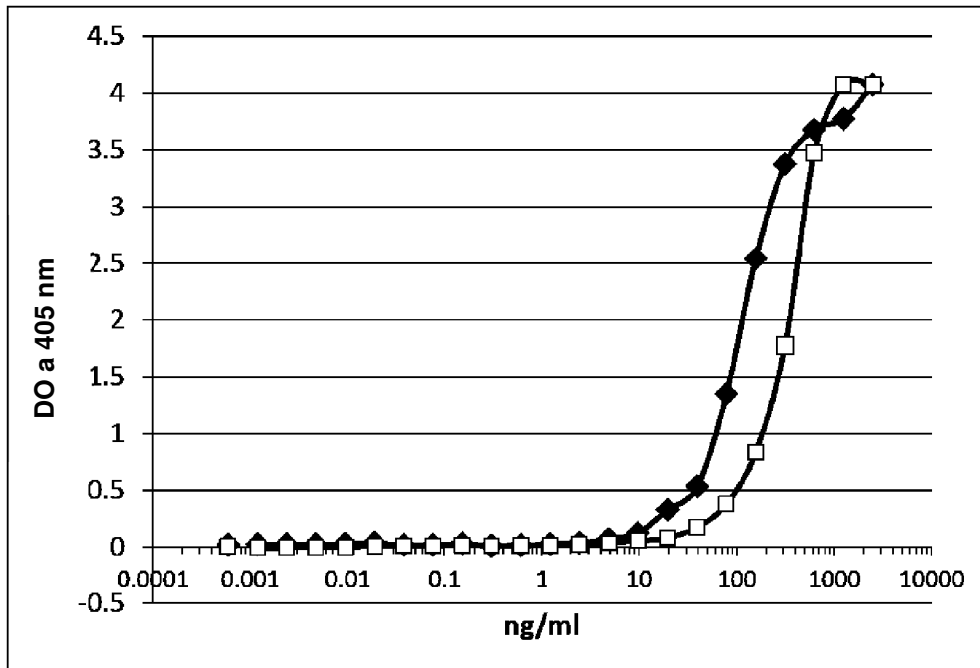


Figura 4

A



B



	EC50 FACS ug/ml	EC50 ELISA ug/ml
N41mab	0.076	0.114
Ha22-2	0.31	0.339

Figura 5 A y B

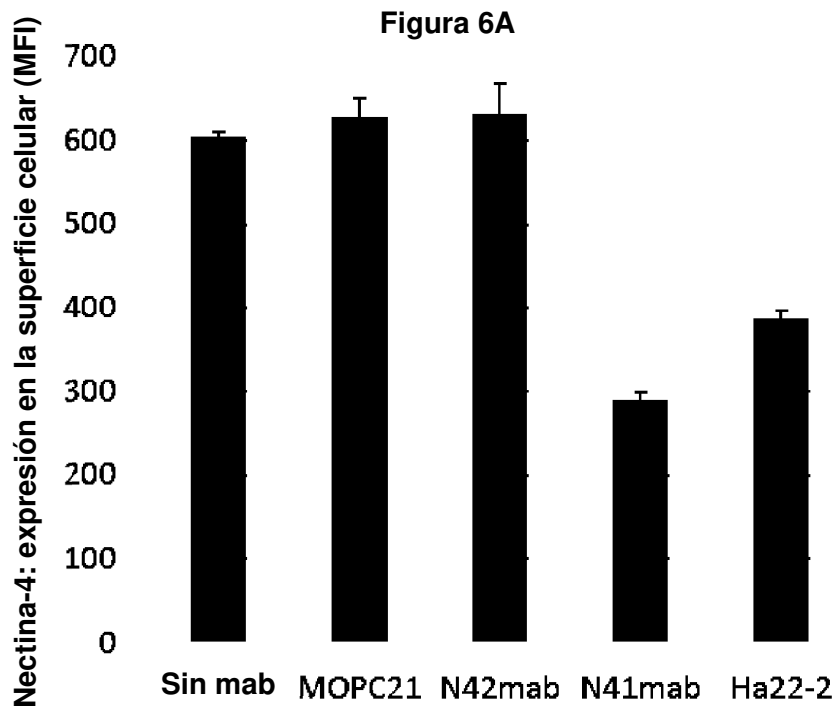
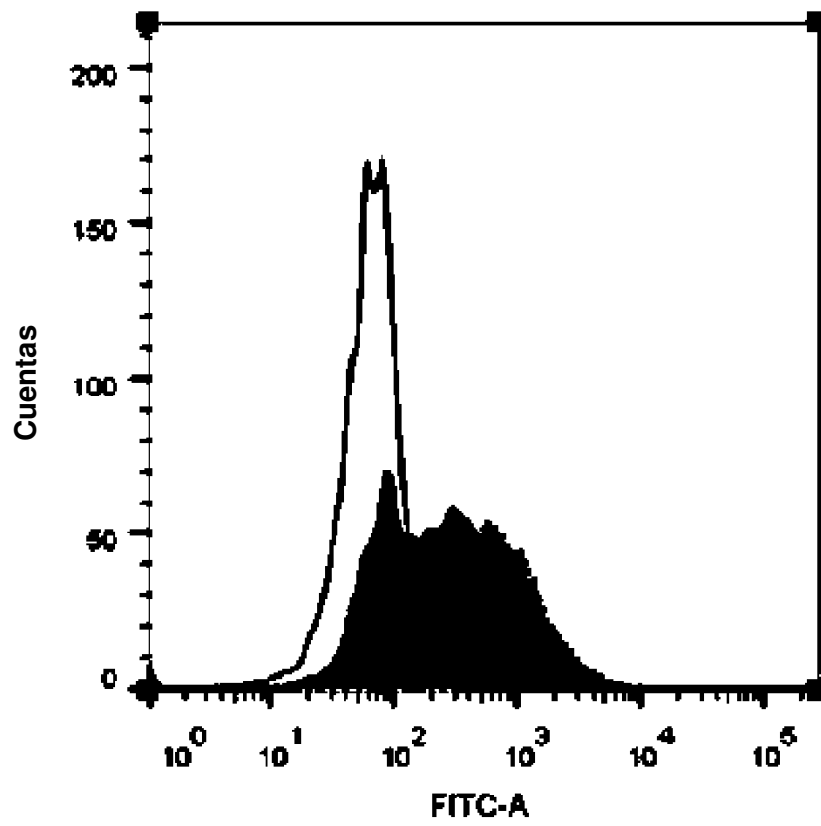


Figura 6B

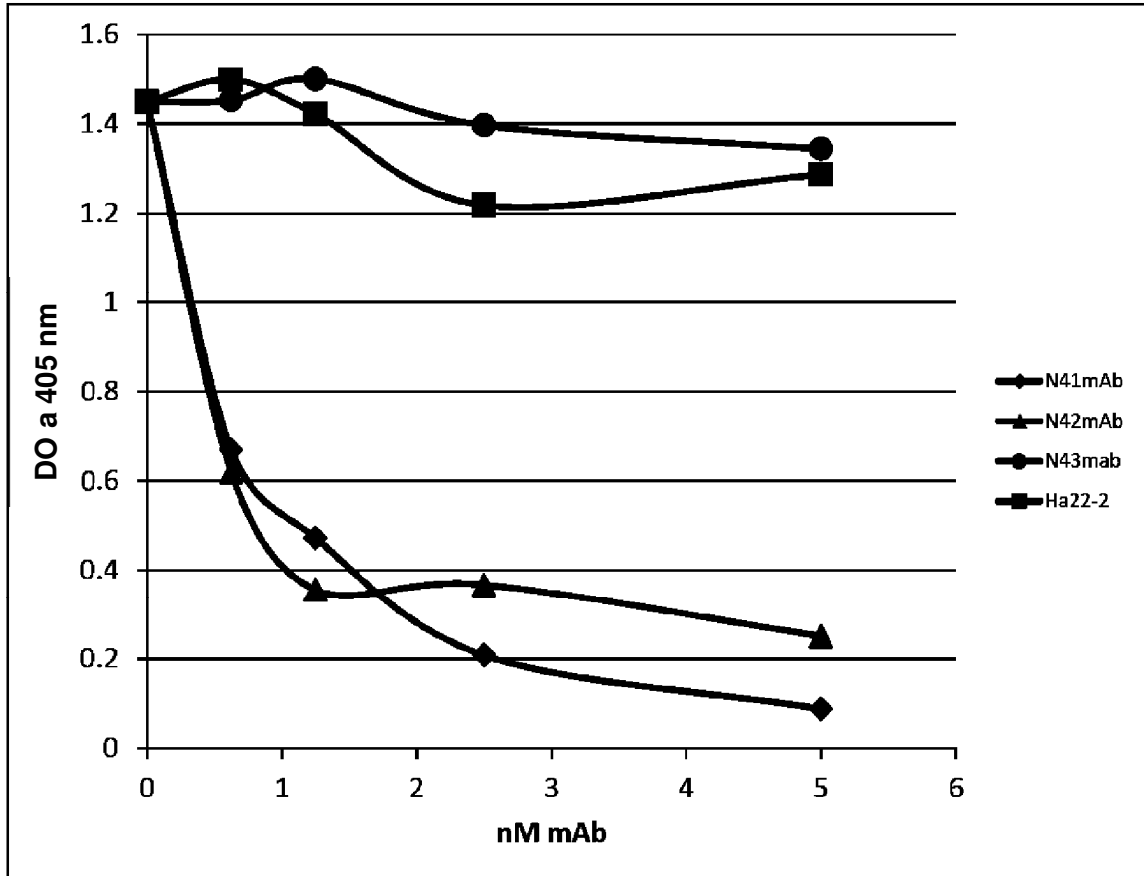
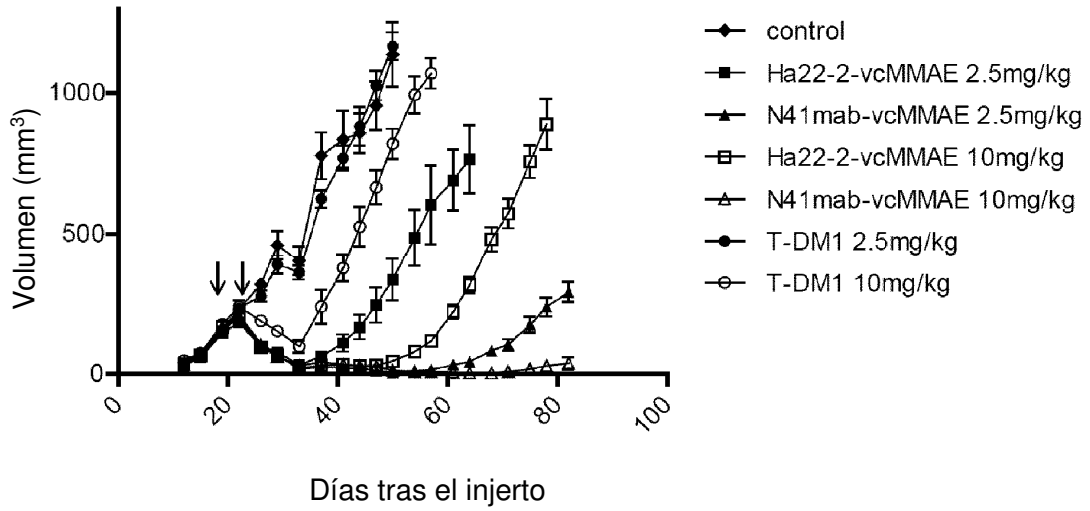
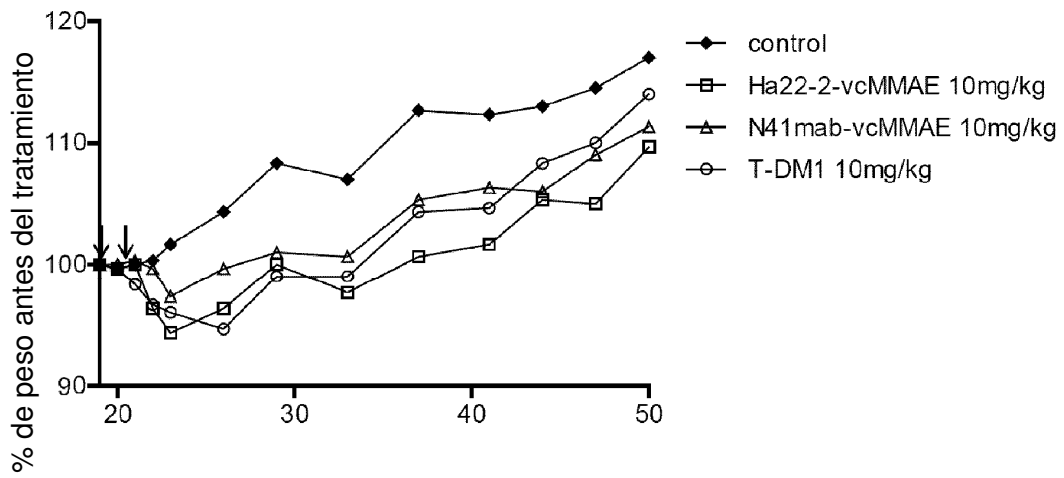


Figura 7

A



B



C

Días tras el injerto	
control	27.5
T-DM1 2.5mg/kg	27.5Día
Ha22-2-vcMMAE 2.5mg/kg	50
N41mab-vcMMAE 2.5mg/kg	82
T-DM1 10mg/kg	42.5
Ha22-2-vcMMAE 10mg/kg	68
N41mab-vcMMAE 10mg/kg	>82

Figura 8

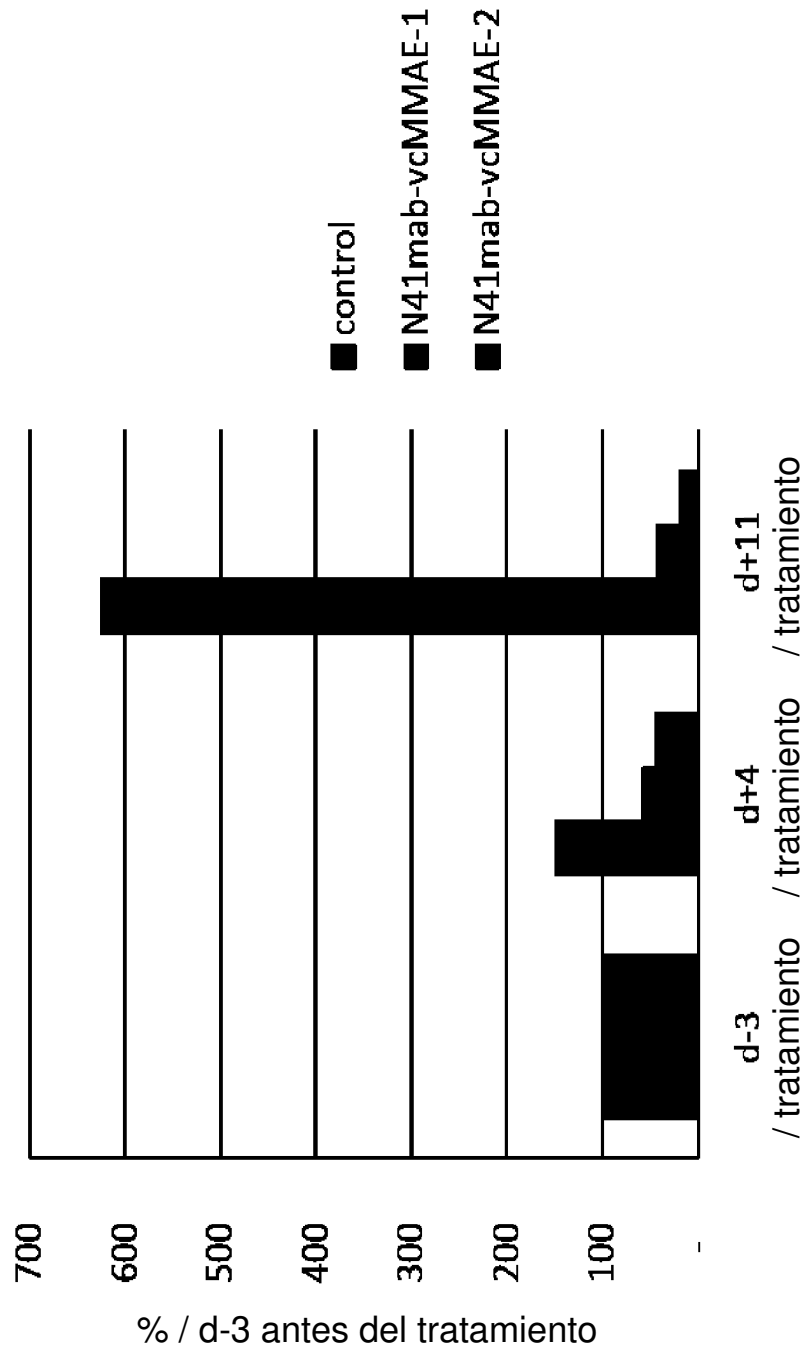


Figura 9