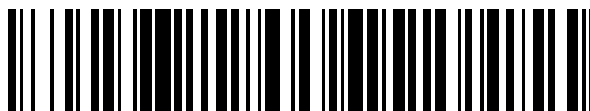


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 560**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2016 PCT/US2016/061219**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2017 WO17083451**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2016 E 16802197 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3374398**

54 Título: **Moléculas de unión específicas para ASCT2 y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**10.11.2015 US 201562253371 P**

**11.11.2015 US 201562253774 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.11.2020**

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)  
One Medimmune Way  
Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**PORE, NABENDU;  
BORROK, MARTIN, J., III;  
CHOWDHURY, PARTHA;  
MICHELOTTI, EMIL, F.;  
TICE, DAVID, A.;  
HOLLINGSWORTH, ROBERT, E. y  
CHANG, CHIEN-YING**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 796 560 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

Moléculas de unión específicas para ASCT2 y usos de las mismas

Antecedentes

5 La familia de transportadores de solutos (SLC) incluye más de 300 genes que codifican proteínas transportadoras de membrana, organizadas en una gran cantidad de subfamilias. La subfamilia SLC1A incluye el sistema de transporte ASC, que media el transporte de aminoácidos neutros dependientes de sodio en células de vertebrados. La alanina, la serina y la cisteína son los sustratos preferentes del sistema ASC. Se han identificado dos subtipos del sistema ASC, el transportador ASC 1 (ASCT1, también conocido como SLC1A4) y el transportador ASC 2 (ASCT2, también conocido como SLC1A5).

10 ASCT2 es una proteína de membrana de múltiples pases de 541 aminoácidos con ocho dominios transmembrana. El peso molecular de ASCT2 varía de 55-75 KD, dependiendo de los diversos perfiles de glucosilación. Además de transportar L-alanina, L-serina y L-cisteína, ASCT2 también transporta L-treonina y L-glutamina. Además, ASCT2 actúa como un receptor de superficie celular que se comparte con el retrovirus de simio tipo D y los virus tipo C. El documento US2012039904 se refiere a anticuerpos o fragmentos de los mismos que reconocen y se unen a una región extracelular de ASCT2.

15 Se ha informado la sobreexpresión de ASCT2 en diversos cánceres, incluyendo cáncer colorrectal, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC), cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas y cánceres hemáticos tales como mieloma y linfoma. Evaluada mediante análisis inmunohistoquímico (IHQ), la sobreexpresión de ASCT2 muestra un mal pronóstico en diversos cánceres, incluyendo el cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de pulmón y cáncer de páncreas (K Kaira, et al. (2015) Histopathology; Shimizu, et al. (2014) BJC; D Witte, et al. (2002) Anticancer Research; R Li, et al. (2003) Anticancer Research). Se ha informado que ASCT2 es un impulsor de la ruta de señalización de la diana en mamífero de la rapamicina (mTOR) y, en consecuencia, del crecimiento tumoral (Nicklin P. et al. (2009) Cell).

20 Los conjugados anticuerpo-fármaco (los ADC, forma siglada de antibody-drug conjugate) representan un prometedor nuevo enfoque terapéutico para tratar de forma más eficaz el cáncer mientras se reducen las toxicidades relacionadas con el fármaco combinando la especificidad de un anticuerpo con la potencia de moléculas pequeñas o toxinas citotóxicas. Un ADC puede comprender una citotoxina, que puede ser una molécula pequeña que se ha modificado químicamente para contener un enlazador. El enlazador se utiliza después para conjugar la citotoxina al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. La citotoxicidad se induce cuando el ADC se une a la superficie del antígeno de una célula positiva para la diana, se internaliza y se transporta al lisosoma, donde la citotoxina se libera después de la proteólisis de un enlazador escindible (por ejemplo, por la cathepsina B que se encuentra en el lisosoma) o a través de degradación proteolítica del anticuerpo, cuando se utiliza un enlazador no escindible para unir la citotoxina al anticuerpo. La citotoxina se transloca después fuera del lisosoma y hacia el citosol, donde, entonces, puede unirse a su diana, dependiendo de su mecanismo de acción. Normalmente, estas citotoxinas inducen la detención del ciclo celular, lo que posteriormente conduce a la apoptosis. Los conjugados correspondientes que contienen agentes de formación e imágenes también representan un nuevo modo prometedor de detectar células cancerosas *in vivo* o *in vitro*.

25 La presente divulgación proporciona moléculas que se unen específicamente a ASCT2 y métodos para el uso de tales moléculas, por ejemplo, para la detección de ASCT2, para la administración de un agente heterólogo a una célula o para el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la sobreexpresión de ASCT2, por ejemplo, el cáncer. La presente divulgación proporciona anticuerpos anti-ASCT2 conjugados con un fármaco citotóxico, tal como un derivado de tubulicina o una pirrolobenzodiazepina (los ADC de anti-ASCT2). Los anticuerpos de la invención son útiles para el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la sobreexpresión de ASCT2, por ejemplo, el cáncer. Por ejemplo, los inventores han demostrado que los ADC de anti-ASCT2 provocan la regresión tumoral en modelos de ratones xenogénicos de cánceres colorrectales y de cabeza y cuello humanos.

Breve compendio de la invención

30 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo del transportador de aminoácidos neutros 2 (ASCT2), en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) de una región variable de cadena pesada (VH) y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) de una región variable de cadena ligera (VL), en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende: (a) una HCDR1 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; una HCDR2 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; una HCDR3 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una LCDR1 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; una LCDR2 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; y una LCDR3 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; o (b) una HCDR1 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; una HCDR2 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; una HCDR3 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; una LCDR1

de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; una LCDR2 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; y una LCDR3 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

5 En algunas realizaciones, el VH del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y el VL comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el VH comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y el VL comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, el VH comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y el VL comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, el VH comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y el VL comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

10 En algunas realizaciones, el fragmento de unión a anticuerpo o antígeno comprende una región constante de IgG que comprende una inserción de cisteína (C) entre la serina (S) en la posición 239 y la valina (V) en la posición 240, en la que la numeración corresponde al Índice UE en Kabat.

En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

15 En algunas realizaciones, cuando el anticuerpo se une a ASCT2 en la superficie celular, el anticuerpo se internaliza en la célula.

En algunas realizaciones, el fragmento de unión a anticuerpo o antígeno comprende una región constante de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en una región constante de kappa humana y una región constante de lambda humana.

20 En algunas realizaciones, el fragmento de unión a anticuerpo o antígeno comprende una región constante de kappa humana de la SEQ ID NO: 26.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se conjuga adicionalmente con una citotoxina seleccionada del grupo que consiste en un agente antimicrobiano, un agente terapéutico, un profármaco, un péptido, una proteína, una enzima, un lípido, un modificador de respuesta biológica, un agente farmacéutico, una linfocina, un anticuerpo heterólogo, un fragmento de un anticuerpo heterólogo, un marcador detectable, un polietilenglicol (PEG), un radioisótopo y una combinación de dos o más de dichas citotoxinas. En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno se conjuga con una citotoxina. En algunas realizaciones, la citotoxina se selecciona de un derivado de tubulisina y una pirrolobenzodiazepina. En algunas realizaciones, el derivado de tubulisina es tubulisina AZ1508. En algunas realizaciones, la pirrolobenzodiazepina se selecciona de SG3315 y SG3249.

30 En algunas realizaciones, el fragmento de unión a anticuerpo o antígeno se une a ASCT2 humano y ASCT2 de mono cinomolgo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno no se une específicamente a ASCT1 humano.

35 En un segundo aspecto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

En un tercer aspecto, se proporciona un polinucleótido o combinación de polinucleótidos que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

40 En un cuarto aspecto, se proporciona un método para fabricar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con el primer aspecto de la invención que comprende cultivar un huésped que comprende un polinucleótido del tercer aspecto de la invención.

45 En un quinto aspecto, se proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del primer aspecto de la invención o una composición farmacéutica del segundo aspecto de la invención para uso en el tratamiento de un cáncer caracterizado por sobreexpresión de ASCT2, en el que dicho tratamiento comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o dicha composición farmacéutica.

Breve descripción de los dibujos/figuras

50 La **Fig. 1A** muestra la cuantificación del análisis por citometría de flujo que demuestra una alta expresión de ASCT2 en los aspirados de médula ósea de muestras de LMA y MM, en comparación con la médula ósea de muestras sanas.

La **Fig. 1B** muestra una alta expresión de ASCT2 en la población de CD34+/CD38+, marcadores descritos que definen la población de células madre leucémicas (CML). Además, se evaluó la expresión de ASCT2 en todos los otros subtipos, tales como las poblaciones de CD34+CD38-, CD34+CD38+ y CD34-CD38+.

La **Fig. 1C** muestra la expresión de ASCT2 en células plasmáticas (CP; CD138+/CD19-) y células madre (CM; CD138-/CD19+) procedentes de muestras de MM.

La **Fig. 1D** muestra la expresión de ASCT2 evaluada en una población de células EpCAM+/CD24+/CD44+, marcadores descritos para las CMC pancreáticas. Los análisis por citometría de flujo sugieren una alta expresión de ASCT2 de la CMC en tumores de páncreas.

La **Fig. 1E** muestra la destrucción de la población de las CMC (EpCAM+/CD24+/CD44+) en tumores de páncreas después del tratamiento con un ADC ASCT2-PBD (el anticuerpo 17c10 está conjugado con SG3249) *in vivo*.

La **Fig. 2** muestra un gráfico que representa el cambio en veces en la actividad de unión de las IgG anti-ASCT2 humanas purificadas 1e8, 3f7, 5a2, 9b3, 10c3, 16b8, 17c10 y 17a10 para células 293F transfectadas con un plásmido que expresa ASCT2 humana.

La **Fig. 3A** muestra un gráfico de barras de la viabilidad relativa con respecto a la de las células de control no tratadas, de células 293F que expresan ASCT2 tratadas con control negativo (no tratadas); tratadas con los anticuerpos anti-ASCT2 primarios 1e8 y 17c10; tratadas con un anticuerpo anti-ASCT2 conjugado con saporina o tratadas con un anticuerpo de control unido a saporina (IgGh-saporina).

La **Fig. 3B** muestra un gráfico de la citotoxicidad de 1 E8 anti-ASCT2, 17C10 anti-ASCT2 y R347 de control de isotipo conjugados de forma clásica con tubulicina AZ1508 en células Sw48.

La **Fig. 4** muestra un gráfico de barras que representa la unión de los anticuerpos anti-ASCT2 17c10 y 1e8 a células WiDr o células WiDr con una atenuación por ARNhc de la expresión de ASCT2, evaluado mediante citometría de flujo.

La **Fig. 5A** muestra la cinética de internalización del anticuerpo anti-ASCT2 17c10 y de un control de isotipo.

La **Fig. 5B** muestra la cinética de internalización del ADC de ASCT2 (anticuerpo 17c10 conjugado con AZ1508) medido mediante destrucción citotóxica. Las células se pulsaron con ADC de ASCT2 (17c10-AZ1508) durante los respectivos períodos de tiempo. Después de eso, el medio que contenía ADC se reemplazó con medio recién preparado y se incubó adicionalmente durante 4 días. La viabilidad celular se midió utilizando el kit CTG. Las curvas de respuesta en función de la dosis se representaron como un porcentaje de las células de control no tratadas.

La **Fig. 6A a la Fig. 6H** muestran gráficos de citometría de flujo resultantes de la unión de los anticuerpos anti-ASCT2 17c10 y 1e8, y el control de isotipo R347, para líneas celulares que expresan ASCT2. **Fig. 6A**, línea celular de cáncer humano Cal27; **Fig. 6B**, línea celular de cáncer humano FaDu; **Fig. 6C**, línea celular de cáncer humano SSC15; **Fig. 6D** línea celular de cáncer humano WiDr; **Fig. 6E**, células CHOK1 que expresan de forma estable ASCT2 humano; **Fig. 6F**, células CHOK1 que expresan de forma estable ASCT2 de cyno; **Fig. 6G**, línea celular de cáncer de cyno CynoMK1 y **Fig. 6H** células CHOK1 transfectadas de forma simulada.

La **Fig. 7A** muestra que la unión del anticuerpo anti-ASCT2 17c10 a células SKMEL-2 no se modificó por los ARNhc de ASCT1, mientras que la unión se redujo de forma significativa después de la atenuación por ARNhc específica de ASCT2.

La **Fig. 7B** muestra que la destrucción citotóxica del ADC de anticuerpo anti-ASCT2 (anticuerpo 17c10 conjugado con AZ1508) no se vio afectada después de la atenuación por ARNhc de ASCT1, mientras que se observó una reducción significativa de la destrucción citotóxica después del silenciamiento por ARNhc de ASCT2. Los datos de todos los grupos de atenuación por ARNhc se normalizaron con respecto a los controles no tratados.

Las **Fig. 8A y Fig. 8B** muestran los efectos citotóxicos de los anticuerpos anti-ASCT2 17c10 (**Fig. 8A**) y 1e8 (**Fig. 8B**), conjugados con tubulicina 1508 frente a líneas celulares CHO-K1 estables que expresan las proteínas ASCT2 humana o de cyno, o un receptor irrelevante.

Las **Fig. 9A a Fig. 9D** muestran gráficos de citometrías de flujo para la unión del anticuerpo parental 17c10, el anticuerpo convertido a estirpe germinal 17c10 y el anticuerpo de control de isotipo R347, a líneas celulares CHO-K1 estables que expresan ASCT2 humana (**Fig. 9A**); líneas celulares CHO-K1 estables que expresan ASCT2 de cyno (**Fig. 9B**); células de cáncer colorrectal WiDr que expresan ASCT2 (**Fig. 9C**) y células de control transfectadas de forma simulada (**Fig. 9D**).

Las **Fig. 10A a Fig. 10F** muestran la viabilidad relativa (%) normalizada con respecto a la de las células de control no tratadas de líneas celulares de cáncer tratadas con anticuerpo anti-ASCT2 17c10 conjugado con tubulicina AZ1508 y anticuerpo de control de isotipo R347 conjugado con tubulicina AZ1508, para células de cáncer de páncreas (**Fig. 10A**), células de cáncer de colon (**Fig. 10B**), células de cáncer de pulmón (**Fig. 10C**), células de cáncer de CCECC (**Fig. 10D**), células de cáncer de próstata (**Fig. 10E**) y una línea celular que no expresa ASCT2 (**Fig. 10F**).

La **Fig. 11A** muestra la viabilidad relativa normalizada con respecto a la de las células tratadas con un anticuerpo de control conjugado con SG3249, con el anticuerpo anti-ASCT2 17c10 conjugado con SG3249.

La **Fig. 11B** muestra la viabilidad relativa normalizada con respecto a la de las células tratadas con un anticuerpo de control conjugado con SG3315, con el anticuerpo anti-ASCT2 17c10 conjugado con SG3315.

Las **Fig. 12A, Fig. 12B y Fig. 12C** muestran el curso temporal del volumen tumoral en un cáncer colorrectal WiDro o un modelo de xenoinjerto de cáncer de páncreas primario después del tratamiento con anticuerpo anti-ASCT2 17c10 conjugado con tubulisisina o las PBD. **Fig. 12A**, el anticuerpo 17c10 está conjugado con tubulisisina 1508; **Fig. 12B**, el anticuerpo anti-ASCT2 17c10 está conjugado con SG 3315; **Fig. 12C**, el anticuerpo anti-ASCT2 17c10 está conjugado con SG 3249.

La **Fig. 13A** muestra la eficacia antitumoral de un ADC ASCT2-PBD (el anticuerpo 17c10 está conjugado con SG3249) en un modelo de ratón de LMA TF1alfa diseminado. El ADC y el control de isotipo se administraron con una pauta Q1Wx4. La morbilidad y la mortalidad se controlaron de forma diaria. Todos los niveles de dosis del ADC (0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 mg/kg) mejoraron de forma significativa la supervivencia en comparación con el grupo de control no tratado. Los datos se presentan en un gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra el destino de los animales individuales dentro de cada grupo.

La **FIG. 13B** muestra la eficacia antitumoral de un ADC de ASCT2-PBD (el anticuerpo 17c10 está conjugado con SG3249) en un modelo de ratón de MM MM.1S diseminado. Los ratones se trataron con ADC o control de isotipo como se describe en la **Fig. 13A**. La morbilidad y la mortalidad se controlaron de forma diaria. Ambos niveles de dosis de ADC (0.1 y 0.4 mg/kg) mejoraron de forma significativa la supervivencia (117 y 123.5 días, respectivamente) en comparación con el grupo de control no tratado (55.5 días). Los datos se presentan en un gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier que muestra el destino de los animales individuales dentro de cada grupo.

20 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen específicamente a ASCT2. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, se conjuga con un agente, preferentemente una citotoxina. Se incluyen polinucleótidos que codifican los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, vectores que contienen los polinucleótidos y células hospedadoras que expresan los anticuerpos. También se proporcionan composiciones que comprenden los anticuerpos anti-ASCT2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y los métodos de preparación de los anticuerpos anti-ASCT2 y fragmentos de unión a antígeno. Se proporcionan adicionalmente métodos de uso de los nuevos anticuerpos anti-ASCT2, tales como en aplicaciones de diagnóstico o en métodos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la sobreexpresión de ASCT2, por ejemplo, el cáncer.

30 Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen en primer lugar determinados términos. Las definiciones adicionales se exponen a lo largo de la Descripción detallada.

## I. Definiciones

Como se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Los términos “un” o “una”, así como las expresiones “uno/a o más” y “al menos uno/a” se pueden utilizar indistintamente en el presente documento.

Adicionalmente, “y/o” debe tomarse como la divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por lo tanto, la expresión “y/o”, como se usa en una frase tal como “A y/o B”, pretende incluir A y B, A o B, A (solo) y B (solo). Asimismo, la expresión “y/o”, como se usa en una frase tal como “A, B y/o C” pretende incluir A, B y C; A, B o C; A o B; A o C; B o C; A y B; A y C; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Siempre que se describan realizaciones con la expresión “que comprende”, se incluyen realizaciones por lo demás análogas descritas en términos de “que consiste en” y/o “que consiste esencialmente en”.

45 A menos que se definan de otro modo, todos los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que interpreta normalmente un experto en la materia a la que se refiere la presente invención. Por ejemplo, *The Dictionary of Cell and Molecular Biology* (5ª ed. J.M. Lackie ed., 2013), el *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology* (2ª ed. R. Cammack et al. eds., 2008) y *The Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology*, P-S. Juo, (2ª ed. 2002), pueden proporcionar a un experto en la materia definiciones generales de algunos términos utilizados en el presente documento.

50 Las unidades, los prefijos y los símbolos se indican con su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxilo. Los encabezamientos que se proporcionan en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención, los cuales se pueden considerar por referencia a la memoria descriptiva en conjunto. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más detalladamente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

En el presente documento, se hace referencia a los aminoácidos mediante sus símbolos de tres letras conocidos habitualmente o mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Asimismo, se hace referencia a los nucleótidos mediante sus códigos de una única letra aceptados habitualmente.

5 El término "ASCT2" se refiere a la proteína del transportador de aminoácidos 2 del sistema ASC, y/o fragmentos activos del mismo. ASCT2 es una proteína transmembrana que participa en el transporte de aminoácidos neutros pequeños, incluyendo glutamina, alanina y serina, cisteína y treonina, de una manera dependiente de Na<sup>+</sup>. Las secuencias de ARN, ADN y aminoácidos de ASCT2 son conocidas para los expertos en la materia y se pueden encontrar en muchas bases de datos, por ejemplo, en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Los ejemplos de estas secuencias encontradas en el NCBI son las secuencias de ASCT2  
10 humanas que tienen Números de Referencia de GenBank NM\_005628 y NP\_005619; las secuencias de ASCT2 de mono cinomolgo (*Macaca fascicularis*) con Referencia de GenBank NM\_001284054 y NP-001270983.

Los términos "inhibir", "bloquear" y "suprimir" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a cualquier disminución estadísticamente significativa de la actividad biológica, incluyendo el bloqueo total de la actividad. Por ejemplo, "inhibición" puede referirse a una reducción de aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de una actividad biológica o proceso.

Los términos "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se utilizan indistintamente en el presente documento. Un anticuerpo típico comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta de una región variable de la cadena pesada (que se abrevia en el presente documento como VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta de una región variable de la cadena ligera (que se abrevia en el presente documento como VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta de un dominio, CL. Las regiones de VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FW). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FW, dispuestas del extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden participar en la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos del hospedador, incluidas diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Los anticuerpos ejemplares de la presente divulgación incluyen los anticuerpos monoclonales murinos producidos por hibridoma 17c10 y 1e8, humanizados, de afinidad optimizada, convertidos a estirpe germinal, y/u otras versiones de estos anticuerpos, y anticuerpos YTE anti-ASCT2 de semivida optimizada en suero (por ejemplo, K44VHa-N56Q, K44VHa6-N56Q, o K2Ha-N56Q).

35 La expresión "conversión a estirpe germinal" significa que aminoácidos en posiciones específicas en un anticuerpo se retromutan a los aminoácidos de la estirpe germinal.

El término "anticuerpo" se puede referir a una molécula de inmunoglobulina que reconoce y se une específicamente a una diana, tal como una proteína, un polipéptido, un péptido, un hidrato de carbono, un polinucleótido, un lípido o combinaciones de los anteriores, a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno dentro de la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos policlonales intactos, anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo (tales como fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv), mutantes de Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos multiespecíficos, tales como anticuerpos biespecíficos generados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, proteínas de fusión que comprenden una porción de determinación antigénica de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno en tanto que los anticuerpos presenten la actividad biológica deseada. Un anticuerpo puede ser de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, o subclases (isotipos) de las mismas (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), basándose en la identidad de sus dominios constantes de la cadena pesada denominados alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las diferentes clases de inmunoglobulinas tienen estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales distintas y bien conocidas. Los anticuerpos pueden estar desnudos o conjugados con otras moléculas tales como toxinas, radioisótopos, etc.

La expresión "anticuerpo frente a ASCT2" o "anticuerpo que se une a ASCT2" o "anti-ASCT2" se refiere a un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a ASCT2 con suficiente afinidad de manera tal que el anticuerpo sea útil como un agente terapéutico o un reactivo de diagnóstico en el direccionamiento a ASCT2. El grado de unión de un anticuerpo anti-ASCT2 a una proteína distinta de ASCT2 no relacionada es menor de aproximadamente el 10 % de la unión del anticuerpo a ASCT2 medido, por ejemplo, mediante un radioinmunoensayo (RIA), o BIACORE® (utilizando ASCT2 recombinante como el analito y anticuerpo como el ligando, o viceversa), KINEXA® u otros ensayos de unión conocidos en la técnica. En determinadas realizaciones, un anticuerpo que se une a ASCT2 tiene una constante de disociación (K<sub>D</sub>) de ≤1 μM, ≤100 nM, ≤10 nM, ≤1 nM, ≤0.1 nM, ≤10 pM, ≤1 pM o ≤0.1 pM.

La expresión “fragmento de unión a antígeno” se refiere a una porción de un anticuerpo intacto y se refiere a las regiones variables determinantes de complementariedad de un anticuerpo intacto. Los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa pueden ser un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, anticuerpos lineales, anticuerpos monocatenarios (por ejemplo, los scFv) y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un “anticuerpo monoclonal” (mAb) se refiere a una población de anticuerpos homogénea implicada en el reconocimiento y la unión altamente específicos de un único determinante antigénico o epítipo. Esto está en contraste con los anticuerpos policlonales, que incluyen normalmente distintos anticuerpos dirigidos frente a distintos determinantes antigénicos. La expresión “anticuerpo monoclonal” abarca anticuerpos monoclonales tanto intactos como de longitud completa, así como fragmentos de anticuerpo (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), mutantes monocatenarios (scFv), proteínas de fusión que comprenden una porción de un anticuerpo y cualquier otra molécula de inmunoglobulina modificada que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno. Además, “anticuerpo monoclonal” se refiere a tales anticuerpos fabricados de varias maneras que incluyen, pero sin limitación, hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante y animales transgénicos.

La expresión “anticuerpo humanizado” se refiere a un anticuerpo obtenido de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, murina), que se ha diseñado técnicamente para que contenga secuencias mínimas no humanas (por ejemplo, murinas). Normalmente, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas en las cuales se reemplazan restos de la región determinante de complementariedad (CDR) por restos de la CDR de una especie no humana (por ejemplo, ratón, rata, conejo o hámster) que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas (Jones *et al.*, 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science*, 239:1534-1536). En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FW) del Fv de una inmunoglobulina humana se reemplazan con los restos correspondientes de un anticuerpo de una especie no humana que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas.

Los anticuerpos humanizados pueden modificarse adicionalmente mediante la sustitución de restos adicionales en la región marco conservada del Fv y/o dentro de los restos no humanos reemplazados para perfeccionar y optimizar la especificidad, afinidad y/o capacidad del anticuerpo. En general, los anticuerpos humanizados comprenderán sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos o tres, dominios variables que contienen todas o sustancialmente todas las regiones CDR que corresponden a la inmunoglobulina no humana mientras que todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina o dominio (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Los ejemplos de métodos utilizados para generar anticuerpos humanizados se describen en las patentes de Estados Unidos N.º 5,225,539 o 5,639,641.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un ingrediente en una formulación farmacéutica, distinto de un principio activo, que no es tóxico para un sujeto. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye, pero sin limitación, un tampón, excipiente, estabilizante o conservante. Como se usa en el presente documento, “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción/reabsorción, y similares, que son fisiológicamente compatibles.

Una “región variable” de un anticuerpo se refiere a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo o la región variable de la cadena pesada del anticuerpo, ya sea sola o en combinación. Las regiones variables de la cadena pesada y ligera consisten cada una en cuatro regiones marco conservadas (FW) conectadas por tres regiones determinantes de complementariedad (CDR), también conocidas como regiones hipervariables. Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad mediante las regiones FW y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio unión al antígeno de los anticuerpos. Existen al menos dos técnicas para determinar las CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia entre especies (es decir, Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5ª ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Al-lazikani *et al.* (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). Además, a veces se utilizan en la técnica combinaciones de estas dos estrategias para determinar las CDR.

Generalmente, se utiliza el “Sistema de numeración de Kabat” cuando se hace referencia a un resto en el dominio variable (aproximadamente, los restos 1-107 de la cadena ligera y los restos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

La numeración de la posición del aminoácido según Kabat se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de la cadena pesada o los dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o

una inserción en, una FW o CDR del dominio variable esta. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir una inserción de un único aminoácido (resto 52a de acuerdo con Kabat) después del resto 52 de H2 y restos insertados (por ejemplo, los restos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del resto 82 de la FW de la cadena pesada.

- 5 La numeración de Kabat de los restos puede determinarse para un dado anticuerpo mediante el alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia con numeración de Kabat "convencional". Chothia se refiere en cambio al emplazamiento de los bucles estructurales (Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). El final del bucle CDR-H1 de Chothia, cuando se numera utilizando la convención de numeración de Kabat, varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat sitúa las inserciones en H35A y H35B; si no está presente ni 35A ni 35B, el bucle termina en 32; si solo está presente 35A, el bucle termina en 33; si están presentes tanto 35A como 35B, el bucle termina en 34). Las regiones hipervariables de AbM representan un término intermedio entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y se utilizan mediante el programa informático de modelado de anticuerpos AbM, de Oxford Molecular. La Tabla 1 enumera a continuación las posiciones de los aminoácidos que comprenden las regiones variables de los anticuerpos en cada sistema.

**TABLA 1**  
**POSICIONES DE LOS AMINOÁCIDOS EN CADA SISTEMA**

Región	Kabat	AbM	Chothia
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
HCDR1 <sup>1</sup>	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
HCDR1 <sup>2</sup>	H31-H35	H26-H35	H26-H32
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

<sup>1</sup>Numeración de Kabat

<sup>2</sup>Numeración de Chothia

- 20 ImMunoGeneTics (IMGT) también proporciona un sistema de numeración para las regiones variables de inmunoglobulina, que incluyen las CDR. Véase, por ejemplo, Lefranc, M.P. *et al., Dev. Comp. Immunol.* 27: 55-77(2003). El sistema de numeración de IMGT está basado en un alineamiento de más de 5,000 secuencias, datos estructurales y caracterización de bucles hipervariables, y permite una fácil comparación de las regiones variables y CDR para todas las especies. De acuerdo con el esquema de numeración de IMGT, VH-CDR1 está en las posiciones 26 a 35, VH-CDR2 está en las posiciones 51 a 57, VH-CDR3 está en las posiciones 93 a 102, VL-CDR1 está en las posiciones 27 a 32, VL-CDR2 está en las posiciones 50 a 52 y VL-CDR3 está en las posiciones 89 a 97.

- 25 Como se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva, las secuencias de las CDR del VH descritas corresponden a los emplazamientos de la numeración de Kabat clásicos, concretamente VH-CDR1 de Kabat está en las posiciones 31-35, VH-CDR2 está en las posiciones 50-65 y VH-CDR3 está en las posiciones 95-102. VL-CDR1, VL-CDR2 y VL-CDR3 también corresponden a los emplazamientos de la numeración de Kabat clásicos, concretamente las posiciones 24-34, 50-56 y 89-97, respectivamente.

- 30 La expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo producido en un ser humano o un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a un anticuerpo producido en un ser humano, fabricado utilizando cualquier técnica conocida en la técnica. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos intactos o de longitud completa, fragmentos de los mismos y/o anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de la cadena pesada y/o ligera humanas tal como, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de la cadena pesada humana y la cadena ligera murinas.

- 35 La expresión "anticuerpos quiméricos" se refiere a anticuerpos en los cuales la secuencia de aminoácidos de la molécula de inmunoglobulina se obtiene de dos o más especies. Normalmente, la región variable de ambas cadenas ligera y pesada corresponde a la región variable de anticuerpos obtenidos de una especie de mamífero (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.) con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas, mientras que las regiones constantes son homólogas a las secuencias de anticuerpos obtenidos de otra (habitualmente ser humano) para evitar provocar una respuesta inmunitaria en esa especie.



El término "YTE" o la expresión "mutante YTE" se refiere a una mutación en el Fc de la IgG1 que da como resultado un aumento de la unión al FcRn humano y mejora la semivida en suero del anticuerpo que tiene la mutación. Un mutante YTE comprende una combinación de tres mutaciones, M252Y/S254T/T256E (numeración EU Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, D.C.), introducida en la cadena pesada de una IgG1. Véase la patente de Estados Unidos n.º 7,658,921. Se ha demostrado que el mutante YTE aumenta la semivida en suero de los anticuerpos en aproximadamente cuatro veces, en comparaciones con las versiones de tipo silvestre del mismo anticuerpo (Dall'Acqua *et al.*, *J. Biol. Chem.* 281:23514-24 (2006); Robbie *et al.*, (2013) *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 6147-6153). Véase también la Patente de Estados Unidos N.º 7,083,784.

Generalmente, "afinidad de unión" se refiere a la fuerza de la suma total de las interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su pareja de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se utiliza en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su pareja Y puede representarse generalmente mediante la constante de disociación ( $K_D$ ). Puede medirse la afinidad mediante métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen los descritos en el presente documento. Los anticuerpos con una baja afinidad generalmente se unen al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos con una alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápido y tienden a permanecer unidos más tiempo. Se conocen en la técnica una diversidad de métodos de medición de la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede utilizarse para los fines de la presente invención.

La potencia de la molécula de unión se expresa normalmente como un valor de  $CI_{50}$  en ng/ml, a menos que se establezca otra cosa. La  $CI_{50}$  es la mediana de la concentración inhibitoria de una molécula de un anticuerpo. En ensayos funcionales, la  $CI_{50}$  es la concentración que reduce una respuesta biológica en un 50 % de su máximo. En estudios de unión de ligando, la  $CI_{50}$  es la concentración que reduce la unión a un receptor en un 50 % del nivel de unión específica máximo. Puede calcularse la  $CI_{50}$  mediante cualquiera de varios medios conocidos en la técnica.

Las mejora en veces de la potencia para los anticuerpos o polipéptidos de la invención, en comparación con un anticuerpo de referencia, puede ser de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 10 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 90 veces, al menos aproximadamente 100 veces, al menos aproximadamente 110 veces, al menos aproximadamente 120 veces, al menos aproximadamente 130 veces, al menos aproximadamente 140 veces, al menos aproximadamente 150 veces, al menos aproximadamente 160 veces, al menos aproximadamente 170 veces, o al menos aproximadamente 180 veces o más.

La potencia de unión de un anticuerpo se expresa normalmente como un valor de  $CE_{50}$  en nM o pM, a menos que se indique otra cosa. La  $CE_{50}$  es la concentración de un fármaco que induce una mediana de la respuesta entre el valor inicial y el máximo después de un tiempo de exposición especificado. Puede calcularse la  $CE_{50}$  mediante cualquiera de varios medios conocidos en la técnica.

Un "anticuerpo terapéutico" es uno que se puede administrar a un sujeto para tratar o prevenir una enfermedad o afección. Un "sujeto" es cualquier individuo, en particular un mamífero, para quien se desea un diagnóstico, pronóstico o terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja, animales de competición y animales de zoológicos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, etc.

"Tratar" se refiere a medidas terapéuticas que curan, ralentizan, reducen síntomas de, y/o detienen, la progresión de un proceso patológico o trastorno diagnosticado. Por lo tanto, los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tengan el trastorno. En determinadas realizaciones, se "trata" satisfactoriamente a un sujeto para una enfermedad o trastorno, por el ejemplo, el cáncer, de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento si el paciente muestra, por ejemplo, un alivio o eliminación total, parcial o transitoria de los síntomas asociados con la enfermedad o el trastorno.

"Prevenir" se refiere a las medidas profilácticas o preventivas que previenen y/o ralentizan el desarrollo de un proceso patológico o trastorno que tienen como objetivo. Por lo tanto, los que necesitan prevención incluyen a los propensos a tener o que son susceptibles al trastorno. En determinadas realizaciones, se previene de forma satisfactoria una enfermedad o trastorno de acuerdo con los métodos proporcionados en el presente documento, si el paciente desarrolla de manera transitoria o permanente, por ejemplo, menos síntomas o síntomas menos graves asociados con la enfermedad o trastorno, o una aparición más tardía de los síntomas asociados con la enfermedad o trastorno, que un paciente que no se ha sometido a los métodos de la invención.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a una preparación que se encuentra en una forma que permite que la actividad biológica del principio activo sea eficaz y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administre la composición. Dicha composición puede ser estéril y

5 puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica. Las composiciones farmacéuticas adecuadas pueden comprender uno o más de un tampón (por ejemplo, tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina humana), un conservante (por ejemplo, alcohol bencílico), un promotor de la absorción para potenciar la biodisponibilidad y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

Una "cantidad eficaz" de un anticuerpo como se divulga en el presente documento es una cantidad suficiente para llevar a cabo un fin establecido de forma específica. Puede determinarse una "cantidad eficaz" de forma empírica y de manera rutinaria, en relación con el fin establecido.

10 Un "marcador" se refiere a un compuesto o una composición detectable que está conjugado de forma directa o indirecta con la molécula de unión o anticuerpo, de manera que se genera una molécula de unión o anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto de sustrato o una composición que es detectable.

15 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por elementos que no son aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se han modificado de manera natural o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También están incluidos en la definición, por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. En determinadas realizaciones, los polipéptidos pueden presentarse como cadenas individuales o cadenas asociadas.

20 Un "polinucleótido", como se usa en el presente documento, puede incluir uno o más "ácidos nucleicos", "moléculas de ácido nucleico" o "secuencias de ácido nucleico"; se refiere a un polímero de nucleótidos de cualquier longitud e incluye ADN y ARN. Los polinucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en el presente documento, incluyendo ARN y ADN.

30 El término "vector" significa una construcción, que tiene la capacidad de suministrar, y en algunas realizaciones, expresar, uno o más genes o secuencias de interés en una célula hospedadora. Los ejemplos de vectores incluyen, pero sin limitación, vectores víricos, vectores de expresión de ADN o ARN desnudo, plásmidos, cósmidos o vectores de fago, vectores de expresión de ARN o ADN asociados con agentes de condensación catiónicos, vectores de expresión de ARN o ADN encapsulados en liposomas, y determinadas células eucariotas, tales como células productoras.

35 Un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está "aislado", es un polipéptido, anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está en una forma no encontrada en la naturaleza. Los polipéptidos, anticuerpos, polinucleótidos, vectores, células o composiciones aislados incluyen los que se han purificado en un grado en que ya no están en una forma en la que se encuentran en la naturaleza. En algunas realizaciones, un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula o composición que está aislado está sustancialmente puro.

40 Los términos "idéntico" o "identidad" porcentual en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o que tienen un porcentaje especificado de restos de nucleótido o de aminoácido que son iguales, cuando se comparan y alinean (introduciendo huecos, si es necesario) para una máxima correspondencia, sin considerar ninguna de las sustituciones conservativas de aminoácidos como parte de la identidad de secuencia. La identidad porcentual se puede medir utilizando programas informáticos de comparación de secuencias o algoritmos, o mediante inspección visual. En la técnica se conocen diversos algoritmos y programas informáticos que se pueden utilizar para obtener alineamientos de secuencias de aminoácidos o nucleótidos.

45 Uno de tales ejemplos no limitantes de un algoritmo de alineamiento de secuencias es el algoritmo descrito en Karlin *et al.*, *Natl. Acad. Sci. USA*, 87:2264-2268 (1990), modificado por Karlin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5877 (1993) e incorporado en los programas NBLAST y XBLAST (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1991)). En determinadas realizaciones, se puede utilizar Gapped BLAST, como se describe en Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997). BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymol.* 266:460-480 (1996)), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, San Francisco Sur, CA) o Megalign (DNASTAR) son programas de informáticos adicionales de disposición pública que se pueden utilizar para alinear secuencias. En determinadas realizaciones, la identidad porcentual entre dos secuencias de nucleótidos se determina utilizando el programa GAP en el paquete de programas informáticos GCG (por ejemplo, utilizando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 o 90 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6). En determinadas realizaciones alternativas,

se puede utilizar el programa GAP del paquete de programas informáticos GCG, que incorpora el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) para determinar la identidad porcentual entre dos secuencias de aminoácidos (por ejemplo, utilizando una matriz BLOSUM 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4, y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4 o 5). Como alternativa, en determinadas realizaciones, la identidad porcentual entre las secuencias de nucleótidos o aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Myers y Miller (*CABIOS*, 4:11-17 (1989)). Por ejemplo, la identidad porcentual se puede determinar utilizando el programa ALIGN (versión 2.0) y utilizando PAM120 con una tabla de restos, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Un experto en la materia puede determinar los parámetros apropiados para el alineamiento máximo mediante un programa informático de alineamiento particular. En determinadas realizaciones, se utilizan los parámetros predeterminados del programa informático de alineamiento.

En determinadas realizaciones, la identidad porcentual "X" de una primera secuencia de aminoácidos con respecto a una segunda secuencia de aminoácidos se calcula como  $100 \times (Y/Z)$ , donde Y es el número de restos de aminoácido puntuados como coincidencias idénticas en el alineamiento de la primera y la segunda secuencias (como se alinean mediante inspección visual o un programa de alineamiento de secuencias particular) y Z es el número total de restos en la segunda secuencia. Si la longitud de una primera secuencia es mayor que la de la segunda secuencia, la identidad porcentual de la primera secuencia respecto a la segunda secuencia será mayor que la identidad porcentual de la segunda secuencia respecto a la primera secuencia.

Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que se reemplaza un resto de aminoácido con otro resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares, incluidas las cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ejemplo, la sustitución de una tirosina por una fenilalanina es una sustitución conservativa. En determinadas realizaciones, las sustituciones conservativas en las secuencias de aminoácidos de las moléculas de unión, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la invención no anulan la unión de la molécula de unión, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que contiene la secuencia de aminoácidos, al antígeno (o antígenos), es decir, la ASCT2 a la que se une la molécula de unión, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno. Los métodos para identificar sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-1 187 (1993); Kobayashi *et al.*, *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); Burks *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997).

## II. Anticuerpos anti-ASCT2 y fragmentos de unión a antígeno

La presente invención proporciona anticuerpos anti-ASCT2 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a ASCT2. Las secuencias de aminoácidos (aa) y de nucleótidos (nt) de longitud completa de ASCT2 humana y de mono cinomolgo son conocidas en la técnica, y pueden encontrarse, al menos, en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). La base de datos del NCBI está disponible en línea. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-ASCT2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento son anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-ASCT2 están conjugados con una citotoxina, por lo tanto se denominan ADC de anti-ASTC2.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-ASCT2 de la invención se unen a ASCT2 en la superficie de una célula y se internalizan en la célula. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-ASCT2 se internaliza en células que expresan ASCT2 con una  $CI_{50}$  a los 10 minutos de aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 1  $\mu$ g/ml, aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 250 ng/ml, aproximadamente 250 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, aproximadamente 350 ng/ml a aproximadamente 450 ng/ml, aproximadamente 500 ng/ml a aproximadamente 1  $\mu$ g/ml, aproximadamente 500 ng/ml a aproximadamente 750 ng/ml, aproximadamente 750 ng/ml a aproximadamente 850 ng/ml o aproximadamente 900 ng/ml a aproximadamente 1  $\mu$ g/ml. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-ASCT2 se internaliza en células que expresan ASCT2 con una  $CI_{50}$  a los 30 minutos de aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 1  $\mu$ g/ml, aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 250 ng/ml, aproximadamente 250 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, aproximadamente 250 ng/ml a aproximadamente 350 ng/ml, aproximadamente 350 ng/ml a aproximadamente 450 ng/ml, aproximadamente 450 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml a aproximadamente 1  $\mu$ g/ml, aproximadamente 500 ng/ml a aproximadamente 750 ng/ml, aproximadamente 750 ng/ml a aproximadamente 850 ng/ml o aproximadamente 900 ng/ml a aproximadamente 1  $\mu$ g/ml. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-ASCT2 se internaliza en células que expresan ASCT2 con una  $CI_{50}$  a los 120 minutos de aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml, aproximadamente 200 ng/ml a aproximadamente 300 ng/ml, aproximadamente 300 ng/ml a aproximadamente 400 ng/ml o aproximadamente 400 ng/ml a aproximadamente 500 ng/ml. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-ASCT2 se internaliza en células que expresan ASCT2 con una  $CI_{50}$  a las 8 horas de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 250 ng/ml,

aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 25 ng/ml, aproximadamente 25 ng/ml a aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml a aproximadamente 100 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 150 ng/ml, aproximadamente 150 ng/ml a aproximadamente 200 ng/ml o aproximadamente 200 ng/ml a aproximadamente 250 ng/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-ASCT2 conjugado con una citotoxina es un ADC de anti-ASCT2.

En ciertos aspectos, esta divulgación proporciona un anticuerpo anti-ASCT2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR), en el que la HCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; la HCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; la HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; la LCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; la LCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; y la LCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; o la HCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; la HCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; la HCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; la LCDR1 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; la LCDR2 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; y la LCDR3 tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21. Como se proporciona en el presente documento, el VH comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 5; y el VL comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o la SEQ ID NO: 6. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-ASCT2 comprende un VH de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y un VL de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. De forma opcional, el anticuerpo anti-ASCT2 comprende un VH de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o la SEQ ID NO: 7, y un VL de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-ASCT2 comprende un VH de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y un VL de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

Adicionalmente, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a ASCT2, que comprende un VH y un VL, donde el VH y el VL contienen, respectivamente, secuencias de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idénticas a las secuencias de aminoácidos de referencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6; o SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respectivamente.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-ASCT2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende la secuencia de aminoácidos del VH SEQ ID NO: 5 y la secuencia de aminoácidos del VL SEQ ID NO: 6. En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-ASCT2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende la secuencia de aminoácidos del VH SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos del VL SEQ ID NO: 8.

Un anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo como se describe en el presente documento puede ser, por ejemplo, un anticuerpo murino, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo multiespecífico o cualquier combinación de los mismos. Un fragmento de unión a antígeno de anticuerpo anti-ASCT2 puede ser un fragmento Fv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fab', un fragmento dsFv, un fragmento scFv o un fragmento sc(Fv)<sub>2</sub>.

En un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo que puede unirse a moléculas ASCT2 de distintas especies, por ejemplo, el anticuerpo o fragmento puede unirse a ASCT2 de ratón, ASCT2 de rata, conejo, ASCT2, ASCT2 humana y/o ASCT2 de mono cinomolgo. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento puede unirse a ASCT2 humana y a ASCT2 de mono cinomolgo. En un ejemplo adicional, el anticuerpo o fragmento también puede unirse a ASCT2 de ratón.

En determinadas realizaciones proporcionadas en el presente documento, un anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse específicamente a ASCT2, por ejemplo, ASCT2 humana y ASCT2 de mono cinomolgo, pero no se une específicamente a ASCT1 humana.

Un anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo, como se describe en el presente documento, puede incluir, además de un VH y un VL, una región constante de la cadena pesada o fragmento de la misma. En determinados aspectos, la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada humana, por ejemplo, una región constante de IgG humana, por ejemplo, una región constante de IgG1 humana. En algunas realizaciones, en particular cuando el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está conjugado con un agente, tal como un agente citotóxico, se inserta un resto de cisteína entre el aminoácido S239 y V240 en la región CH2 de la IgG1. Esta cisteína se denomina "una inserción 239" o "239i".

En determinados aspectos, una región constante de la cadena pesada o fragmento de la misma, por ejemplo, una región constante de la IgG humana o fragmento de la misma, puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio constante de la IgG de tipo silvestre, en la que la IgG modificada tiene una semivida aumentada en comparación con la semivida de una IgG que tiene el dominio constante de la IgG de tipo silvestre. Por ejemplo, el dominio constante de la IgG puede contener una o más sustituciones de aminoácidos de los restos

de aminoácido de las posiciones 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, en las que la numeración de las posiciones de aminoácido está de acuerdo con el índice EU como se expone en Kabat. En determinados aspectos, el dominio constante de la IgG puede contener una o más de una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 252 con tirosina (Y), fenilalanina (F), triptófano (W) o treonina (T), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 254 con treonina (T), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 256 con serina (S), arginina (R), glutamina (Q), ácido glutámico (E), ácido aspártico (D) o treonina (T), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 257 con leucina (L), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 309 con prolina (P), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 311 con serina (S), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 428 con treonina (T), leucina (L), fenilalanina (F) o serina (S), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 433 con arginina (R), serina (S), isoleucina (I), prolina (P) o glutamina (Q), o una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 434 con triptófano (W), metionina (M), serina (S), histidina (H), fenilalanina (F) o tirosina. De forma más específica, el dominio constante de la IgG puede contener sustituciones de aminoácidos con respecto a un dominio constante de la IgG humana de tipo silvestre, que incluye una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 252 con tirosina (Y), una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 254 con treonina (T) y una sustitución del aminoácido en la posición Kabat 256 con ácido glutámico (E). La presente divulgación proporciona un anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo, donde la cadena pesada es un mutante YTE de IgG1 humana.

Un anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo proporcionado en el presente documento, por ejemplo, como se describe anteriormente, puede incluir, además de un VH y un VL, y opcionalmente una región constante de la cadena pesada o fragmento de la misma, una región constante de la cadena ligera o fragmento de la misma. En determinados aspectos, la región constante de la cadena ligera es una región constante de la cadena ligera kappa lambda, por ejemplo, una región constante de kappa humana o una región constante de lambda humana.

Como se indica anteriormente, una secuencia de aminoácidos del VH y/o VL puede ser, por ejemplo, el 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % similar a una secuencia expuesta en el presente documento, y/o comprender 1, 2, 3, 4, 5 o más sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservativas con respecto a una secuencia expuesta en el presente documento. Un anticuerpo frente a ASCT2 que tiene regiones VH y VL que tienen un determinado porcentaje de similitud con una región VH o región VL, o que tiene una o más sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservativas, puede obtenerse mediante mutagénesis (por ejemplo, mutagénesis dirigida o mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican las regiones VH y/o VL descritas en el presente documento, seguido del análisis de la unión a ASCT2 del anticuerpo codificado modificado y, opcionalmente, el análisis de la función mantenida utilizando los ensayos funcionales descritos en el presente documento.

La afinidad o avidéz de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse de forma experimental utilizando cualquier método adecuado bien conocido en la técnica, por ejemplo, citometría de flujo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o radioinmunoensayo (RIA), o cinética (por ejemplo, análisis KINEXA® o BIACORE™). Se pueden emplear fácilmente formatos de ensayo de unión directa así como ensayos de unión competitiva. (Véase, por ejemplo, Berzofsky *et al.*, *Antibody-Antigen Interactions*, en *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: Nueva York, N.Y. (1984); Kubly, *Immunology*, W. H. Freeman and Company: Nueva York, N.Y. (1992); y los métodos descritos en el presente documento). La afinidad medida de una interacción anticuerpo-antígeno particular puede variar si se mide en condiciones distintas (por ejemplo, concentración de sales, pH, temperatura). Por lo tanto, se realizan mediciones de afinidad y de otros parámetros de unión a antígeno (por ejemplo,  $K_D$  o  $K_d$ ,  $K_{on}$ ,  $K_{off}$ ) con disoluciones normalizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón normalizado, tal como se conoce en la técnica.

En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-ASCT2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se puede unir a células que expresan ASCT2 con una  $CI_{50}$  inferior a aproximadamente 500 nM, inferior a aproximadamente 350 nM, inferior a aproximadamente 250 nM, inferior a aproximadamente 150 nM, inferior a aproximadamente 100 nM, inferior a aproximadamente 75 nM, inferior a aproximadamente 60 nM, inferior a aproximadamente 50 nM, inferior a aproximadamente 40 nM, inferior a aproximadamente 30 nM, inferior a aproximadamente 20 nM, inferior a aproximadamente 15 nM, inferior a aproximadamente 10 nM, inferior a aproximadamente 5 nM, inferior a aproximadamente 1 nM, inferior a aproximadamente 500 pM, inferior a aproximadamente 350 pM, inferior a aproximadamente 250 pM, inferior a aproximadamente 150 pM, inferior a aproximadamente 100 pM, inferior a aproximadamente 75 pM, inferior a aproximadamente 60 pM, inferior a aproximadamente 50 pM, inferior a aproximadamente 40 pM, inferior a aproximadamente 30 pM, inferior a aproximadamente 20 pM, inferior a aproximadamente 15 pM, inferior a aproximadamente 10 pM o inferior a aproximadamente 5 pM, medido por citometría de flujo.

### III. Moléculas de unión que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos anti-ASCT2 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos

La divulgación también proporciona un anticuerpo anti-ASCT2 que se une al mismo epítipo que los anticuerpos anti-ASCT2 descritos en el presente documento. El término "epítipo" se refiere a un determinante proteico diana que tiene la capacidad de unirse a un anticuerpo de la invención. Habitualmente, los epítipos consisten en agrupaciones superficiales activas desde un punto de vista químico de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares, y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características

de carga específicas. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se diferencian en que la unión a los primeros, pero no a los segundos, se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. Tales anticuerpos se pueden identificar basándose en su capacidad para competir de forma cruzada (por ejemplo, inhibir de un modo estadísticamente significativo y de forma competitiva la unión de) con anticuerpos tales como los descritos en el presente documento, en ensayos de unión o actividad de ASCT2 convencionales.

Por consiguiente, la divulgación proporciona anticuerpos anti-ASCT2 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, que compiten por la unión a ASCT2 con otro anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención, tales como los anticuerpos monoclonales murinos 17c10 o 1e8, o las variantes humanizadas como se describe en el presente documento. La capacidad de un anticuerpo de prueba de inhibir la unión de, por ejemplo, de 17c10 o 1e8 demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo por la unión a ASCT2; tal anticuerpo puede, de acuerdo con una teoría no limitante, unirse al mismo epítipo o a un epítipo relacionado (por ejemplo, uno estructuralmente similar o espacialmente próximo) en ASCT2 que el anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo con el que compete. En un caso, el anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une al mismo epítipo en ASCT2 que, por ejemplo, los anticuerpos monoclonales murinos 17c10 o 1e8.

#### IV. Preparación de anticuerpos anti-ASCT2 y fragmentos de unión a antígeno

Los anticuerpos monoclonales anti-ASCT2 se pueden preparar utilizando métodos de hibridomas, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature* 256:495 (1975). Utilizando el método del hibridoma, se inmuniza un ratón, hámster u otro animal hospedador apropiado, como se describe anteriormente, para provocar la producción de anticuerpos por parte de linfocitos, que se unirán específicamente a un antígeno de inmunización. También pueden inmunizarse linfocitos *in vitro*. Después de la inmunización, se aíslan los linfocitos y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada utilizando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar células de hibridoma que se pueden seleccionar a continuación separándolas de los linfocitos no fusionados y de las células de mieloma. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente frente a un antígeno elegido como se determina mediante inmunoprecipitación, inmunotransferencia o un ensayo de unión *in vitro*, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), pueden propagarse a continuación en cultivo *in vitro* utilizando métodos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986) o *in vivo* como tumores con ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales pueden purificarse a continuación a partir del medio de cultivo o líquido ascítico, utilizando métodos conocidos.

Como alternativa, también pueden producirse anticuerpos monoclonales anti-ASCT2 utilizando métodos de ADN recombinante tal como se describe en la patente de Estados Unidos N.º 4,816,567. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan de linfocitos B maduros o célula de hibridoma, tal como mediante RT-PCR utilizando cebadores de oligonucleótidos que amplifican de específicamente los genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, y se determina su secuencia utilizando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesada y ligera se clonan a continuación en vectores de expresión adecuados, que cuando se transfectan en células hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen por lo demás proteína inmunoglobulina, se generan anticuerpos monoclonales por las células hospedadoras. Además, pueden aislarse anticuerpos monoclonales anti-ASCT2 recombinantes o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la especie deseada, a partir de bibliotecas de presentación en fago que expresan las CDR de la especie deseada, como se describe en McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991).

El polinucleótido (o polinucleótidos) que codifica un anticuerpo anti-ASCT2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, puede modificarse adicionalmente de varias maneras distintas utilizando tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En algunas realizaciones, los dominios constantes de las cadenas ligera y pesada de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón, pueden sustituir (1) a aquellas regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o (2) a un polipéptido que no es una inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En algunas realizaciones, las regiones constantes están truncadas o eliminadas para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Puede utilizarse mutagénesis dirigida o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, afinidad, etc. de un anticuerpo monoclonal.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humano o fragmento de unión a antígeno del mismo. Se pueden preparar directamente anticuerpos humanos utilizando diversas técnicas conocidas en la técnica. Se pueden generar linfocitos B humanos inmortalizados inmunizados *in vitro* o aislados a partir de un individuo inmunizado que produce un anticuerpo dirigido frente a un antígeno diana. Véase, por ejemplo, Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985); Boemer *et al.*, *J. Immunol.* 147 (1):86-95 (1991); Patente de Estados Unidos 5,750,373.

Además, el anticuerpo anti-ASCT2 humana o fragmento de unión a antígeno del mismo, puede seleccionarse de una biblioteca en fagos, donde esa biblioteca en fagos expresa anticuerpos humanos como se describe, por ejemplo, en Vaughan *et al.*, *Nat. Biotech.* 14:309-314 (1996); Sheets *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6157-6162 (1998);

Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991); y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991). Las técnicas para la generación y el uso de bibliotecas de anticuerpos en fagos se describen también en las Patentes de Estados Unidos n.º 5,969,108, 6,172,197, 5,885,793, 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068; 6,706,484; y 7,264,963; y Rothe *et al.*, *J. Molec. Biol.* 376:1182-1200 (2008).

- 5 Se conocen en la técnica estrategias de maduración de la afinidad y estrategias de combinación de cadenas, y pueden emplearse para generar anticuerpos humanos de alta afinidad o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Véase Marks *et al.*, *BioTechnology* 10:779-783 (1992).

En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal anti-ASCT2 puede ser un anticuerpo humanizado. También pueden utilizarse, y se conocen bien en la técnica, métodos para diseñar técnicamente, humanizar o acondicionar la superficie de anticuerpos no humanos o humanos. Un anticuerpo humanizado, con la superficie acondicionada o diseñado técnicamente de manera similar puede tener uno o más restos de aminoácido de una fuente que es no humana, por ejemplo, pero sin limitación, ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos restos de aminoácido no humanos se reemplazan por restos que se denominan a menudo restos "importados", que se toman normalmente de un dominio "importado" variable, constante u otro, de una secuencia de ser humano conocida. Tales secuencias importadas se pueden utilizar para reducir la inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar la unión, afinidad, constante de asociación, constante de disociación, avidéz, especificidad, semivida o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica. En general, los restos de CDR están directamente y muy sustancialmente implicados en la influencia de la unión a ASCT2. Por consiguiente, parte o todas las secuencias de CDR no humanas o humanas se mantienen, mientras que las secuencias no humanas de las regiones variable y constante pueden reemplazarse con aminoácidos humanos u otros.

De forma opcional, los anticuerpos también pueden humanizarse, acondicionarse su superficie, diseñarse técnicamente o ser anticuerpos humanos diseñados técnicamente que conservan una afinidad alta por el antígeno ASCT2 y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, se pueden preparar de forma opcional anticuerpos anti-ASCT2 humanizados (o humanos) o técnicamente diseñados, y anticuerpos con la superficie acondicionada, mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales, y diversos productos técnicamente diseñados y humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales, diseñadas técnicamente y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están habitualmente disponibles y los expertos en la materia están familiarizados ellos. Se puede disponer de programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que afectan la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno, tal como ASCT2. De esta manera, se pueden seleccionar y combinar restos de la FW a partir de las secuencias consenso e importada, de modo que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad aumentada por el antígeno (o antígenos) diana.

La humanización, acondicionamiento de la superficie o diseño técnico de los anticuerpos anti-ASCT2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención, se puede realizar utilizando cualquier método conocido tal como, pero sin limitación, los descritos en Jones *et al.*, *Nature* 321:522 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534 (1988); Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987); Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151:2623 (1993); Patentes de Estados Unidos N.º 5,639,641, 5,723,323; 5,976,862; 5,824,514; 5,817,483; 5,814,476; 5,763,192; 5,723,323; 5,766,886; 5,714,352; 6,204,023; 6,180,370; 5,693,762; 5,530,101; 5,585,089; 5,225,539; 4,816,567, 7,557,189; 7,538,195; y 7,342,110; Solicitudes Internacionales WO/1999/006834; WO/1997/020032; WO/1992/011272; WO/92/03461; WO/1994/018219; PCT/GB89/01334; WO/1992/001047; WO/1993/006213; Solicitud de Patente Internacional N.º de Publicación WO90/14443; WO90/14424; WO90/14430; y Patente Europea N.º de Publicación EP 229246.

Los anticuerpos humanizados anti-ASCT2 y fragmentos de unión a antígeno de los mismos también pueden fabricarse en ratones transgénicos que contienen locus de inmunoglobulina humana que son capaces, tras la inmunización, de producir el repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Este enfoque se describe en las patentes de Estados Unidos N.º 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; y 5,661,016.

En determinadas realizaciones, se proporciona un fragmento de anticuerpo anti-ASCT2. Se conocen diversas técnicas para la producción de fragmentos de un anticuerpo. De manera tradicional estos fragmentos se obtienen mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos, como describen, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Meth.* 24:107-117 (1993) y Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985). En determinadas realizaciones, se producen fragmentos de anticuerpos anti-ASCT2 de forma recombinante. Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse y secretarse en *E. coli* u otras células hospedadoras, permitiendo así la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. También pueden aislarse tales fragmentos de anticuerpo anti-ASCT2 de las bibliotecas de anticuerpos en fagos tratadas anteriormente. Los fragmentos de anticuerpo anti-ASCT2 también pueden ser anticuerpos lineales, como se describe en la Patente de Estados Unidos 5,641,870. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el experto en la materia.

De acuerdo con la presente invención, las técnicas pueden adaptarse para la producción de anticuerpos monocatenarios específicos para ASCT2. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 4,946,778). Además, pueden adaptarse métodos para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab para permitir la identificación rápida y eficaz de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada por ASCT2, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos de los mismos. Véase, por ejemplo, Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989). Pueden producirse fragmentos de anticuerpo mediante técnicas conocidas en la técnica incluyendo, pero sin limitación: el fragmento F(ab')<sub>2</sub> producido mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; el fragmento Fab generado reduciendo los puentes disulfuro de un fragmento F(ab')<sub>2</sub>; el fragmento Fab generado mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor; o fragmentos Fv.

En determinados aspectos, un anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede modificarse para aumentar su semivida en suero. Esto puede lograrse, por ejemplo, mediante la incorporación de un epítipo de unión a receptor de rescate en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, mediante la mutación de la región apropiada en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo o incorporando el epítipo en una etiqueta peptídica que se fusiona después al anticuerpo o fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en la parte central (por ejemplo, mediante síntesis de ADN o peptídica), o mediante mutación YTE. Se conocen en la técnica otros métodos para aumentar la semivida en suero de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, conjugación con una molécula heteróloga, tal como PEG.

Los anticuerpos anti-ASCT2 modificados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, como se proporcionan en el presente documento, pueden comprender cualquier tipo de región variable que proporcione la asociación del anticuerpo o polipéptido con ASCT2. En este sentido, la región variable puede comprender, u obtenerse de, cualquier tipo de mamífero en el que pueda inducirse la aparición de una respuesta humoral y generarse inmunoglobulinas frente al antígeno deseado. Como tal, la región variable de un anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser, por ejemplo, de origen humano, murino, de primate no humano (por ejemplo, monos cinomolgos, macacos, etc.) o de origen lupino. En algunas realizaciones, tanto la región variable como la constante de los anticuerpos anti-ASCT2 modificados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son humanas. En otras realizaciones, las regiones variables de anticuerpos compatibles (habitualmente obtenidos de una fuente no humana) se pueden diseñar técnicamente o adaptar de forma específica para mejorar las propiedades de unión o reducir la inmunogenicidad de la molécula. En este sentido, las regiones variables útiles en la presente invención se pueden humanizar o alterar de otra manera a través de la inclusión de secuencias de aminoácidos importadas.

En determinadas realizaciones, los dominios variables de las cadenas tanto pesada como ligera de un anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo, están alterados por al menos el reemplazo parcial de una o más CDR y/o por el reemplazo parcial de la región marco conservada, y cambio de secuencia. Aunque las CDR se pueden obtener a partir de la misma clase o incluso subclase del anticuerpo a partir del cual se obtienen las regiones marco conservadas, se contempla que las CDR se obtengan de un anticuerpo de una clase distinta y, en determinadas realizaciones, de un anticuerpo de una especie distinta. No es necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable donante para transferir la capacidad de unión a antígeno de un dominio variable a otro. En su lugar, tan solo es necesario transferir los restos que son necesarios para mantener la actividad del sitio de unión a antígeno. Dadas las explicaciones expuestas en las patentes de Estados Unidos N.º 5,585,089, 5,693,761 y 5,693,762, estará totalmente dentro de las competencias del experto en la materia llevar a cabo experimentación rutinaria para obtener un anticuerpo funcional con una inmunogenicidad reducida.

A pesar de las alteraciones en la región variable, los expertos en la materia apreciarán que los anticuerpos anti-ASCT2 modificados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la presente invención, comprenderán anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa o fragmentos de unión a antígeno de los mismos) en los cuales al menos una fracción de uno o más de los dominios de la región constante se ha deletado o modificado de otra manera para proporcionar características bioquímicas deseadas, tales como un emplazamiento tumoral aumentado o una semivida en suero reducida, en comparación con un anticuerpo de aproximadamente la misma inmunogenicidad que comprende una región constante nativa o no modificada. En algunas realizaciones, la región constante de los anticuerpos modificados comprenderá una región constante humana. Las modificaciones de la región constante compatibles con la presente invención comprenden adiciones, deleciones o sustituciones de uno o más aminoácidos en un o más dominios. Es decir, los anticuerpos modificados divulgados en el presente documento pueden comprender alteraciones o modificaciones en uno o más de los tres dominios constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) y/o el dominio constante de la cadena ligera (CL). En algunas realizaciones, se contemplan regiones constantes modificadas en las que uno o más dominios se han deletado de forma parcial o completa. En algunas realizaciones, los anticuerpos modificados comprenderán variantes o construcciones con dominios deletados en las que se ha eliminado el dominio CH2 completo (construcciones ΔCH2). En algunas realizaciones, el dominio de la región constante omitido puede reemplazarse por un espaciador corto de aminoácidos (por ejemplo, 10 restos) que proporcione parte de la flexibilidad molecular que normalmente confiere la región constante ausente.

Además de su configuración, se conoce en la técnica que la región constante media varias funciones efectoras. Por ejemplo, los anticuerpos se unen a las células a través de la región Fc, con un sitio de receptor de Fc en la región Fc del anticuerpo que se une a un receptor de Fc (FcR) en una célula. Existen varios receptores de Fc que son



específicos para distintas clases de anticuerpos, incluidas las IgG (receptores gamma), IgE (receptores eta), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión del anticuerpo a los receptores de Fc en la superficie celular desencadena varias respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen el atrapamiento y la destrucción de partículas recubiertas de anticuerpos, la eliminación de complejos inmunitarios, la lisis de células diana recubiertas por anticuerpos por parte de linfocitos citolíticos (que se denomina citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o ADCC), la liberación de mediadores inflamatorios, la transferencia placentaria y el control de la producción de inmunoglobulinas.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-ASCT2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, proporciona funciones efectoras alteradas que, a su vez, afectan al perfil biológico del anticuerpo administrado o fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, la delección o inactivación (a través de mutaciones puntuales u otros medios) de un dominio de la región constante puede reducir la unión al receptor de Fc del anticuerpo modificado en circulación. En otros casos, puede ser que las modificaciones de la región constante, acordes con la presente invención, moderen la unión al complemento y, así, reduzcan la semivida en suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Sin embargo, se pueden utilizar otras modificaciones de la región constante para eliminar uniones disulfuro o fracciones de oligosacárido que permitan una mejor ubicación debido a una especificidad antigénica o flexibilidad del anticuerpo aumentadas. De manera similar, las modificaciones de la región constante, en conformidad con la presente invención, se pueden realizar fácilmente utilizando técnicas bioquímicas o de modificación molecular bien conocidas, totalmente comprendidas dentro del ámbito del experto.

En determinadas realizaciones, una molécula de unión a ASCT2 que es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, no tiene una o más funciones efectoras. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no presenta actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o no presenta actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo no se une a un receptor de Fc y/o factores del complemento. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo no tiene función efectora.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede diseñarse técnicamente para fusionar el dominio CH3 de forma directa con la región bisagra de los anticuerpos modificados respectivos o fragmentos de los mismos. En otras construcciones, puede insertarse un espaciador peptídico entre la región bisagra y los dominios CH2 y/o CH3 modificados. Por ejemplo, pueden expresarse construcciones compatibles en las cuales el dominio CH2 se ha delecionado y el dominio CH3 restante (modificado o no modificado) se une a la región bisagra con un espaciador de 5-20 aminoácidos. Puede añadirse tal espaciador, por ejemplo, para garantizar que los elementos reguladores del dominio constante sigan estando libres y accesibles, o que la región bisagra siga siendo flexible. Los espaciadores de aminoácidos pueden, en algunos casos, demostrar ser inmunogénicos y provocar una respuesta inmunitaria no deseada frente a la construcción. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, cualquier espaciador añadido a la construcción puede ser relativamente no inmunogénico, o incluso omitirse por completo, de modo que se mantengan las cualidades bioquímicas deseadas de los anticuerpos modificados.

Además de la delección de los dominios de la región constante enteros, los anticuerpos anti-ASCT2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento, se pueden modificar mediante la delección parcial o sustitución de unos pocos aminoácidos, o incluso de uno solo, en una región constante. Por ejemplo, la mutación de un único aminoácido en zonas seleccionadas del dominio CH2 puede ser suficiente para reducir sustancialmente la unión del Fc y aumentar de este modo el emplazamiento tumoral. De manera similar, se puede delecionar total o parcialmente uno o más dominios de la región constante que controlan la función efectora (por ejemplo, la unión a C1Q del complemento). Tales delecciones parciales de las regiones constantes pueden mejorar las características seleccionadas del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, la semivida en suero) mientras se dejan otras funciones convenientes asociadas con el dominio de la región constante correspondiente intactas. Además, las regiones constantes de los anticuerpos anti-ASCT2 divulgados y fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden modificarse a través de la mutación o sustitución de uno o más aminoácidos, que potencie el perfil de la construcción resultante. A este sentido, es posible alterar la actividad proporcionada por un sitio de unión conservado (por ejemplo, unión de Fc) mientras se mantiene sustancialmente la configuración y el perfil inmunogénico del anticuerpo modificado, o fragmento de unión a antígeno del mismo. Determinadas realizaciones pueden comprender la adición de uno o más aminoácidos a la región constante para potenciar características convenientes, tales como la disminución o el aumento de la función efectora, o proporcionar más unión a citotoxina o hidratos de carbono. En tales realizaciones, puede ser conveniente insertar o repetir secuencias específicas obtenidas a partir de dominios de la región constante seleccionados.

Los presentes inventores contemplan adicionalmente variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogas a los anticuerpos anti-ASCT2 murinos, quiméricos, humanizados o humanos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, expuestos en el presente documento. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservativas, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, una sustitución conservativa se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro de la misma clase general tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, un aminoácido básico con otro aminoácido básico o un

aminoácido neutro con otro aminoácido neutro. Lo que se pretende mediante una sustitución conservativa de aminoácido es bien conocido en la técnica.

5 Un anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede modificarse adicionalmente para que contenga fracciones químicas adicionales que normalmente no forman parte de la proteína. Estas fracciones derivatizadas pueden mejorar la solubilidad, la semivida biológica o la absorción de la proteína. Las fracciones también pueden reducir o eliminar cualquiera de los efectos secundarios convenientes de las proteínas y similares. Se puede encontrar una revisión general de estas fracciones en Remington's Pharmaceutical Sciences, 22<sup>a</sup> ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012).

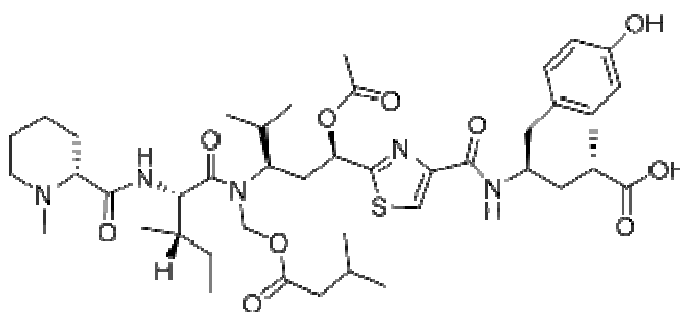
#### V. Conjugados de anticuerpos anti-ASCT2

10 La divulgación proporciona adicionalmente un anticuerpo anti-ASCT2 o fragmento del mismo como se describe anteriormente, conjugado con un agente heterólogo. Para los fines de la presente invención, "conjugado" significa unido a través de un enlace covalente o iónico. En determinados aspectos, el agente puede ser un agente antimicrobiano, un agente terapéutico, un profármaco, un péptido, un proteína, una enzima, un lípido, un modificador biológico de la respuesta, un agente farmacéutico, una linfocina, un anticuerpo heterólogo o fragmento del mismo, 15 un marcador detectable, un PEG y una combinación de dos o más de cualquiera de dichos agentes. En algunas realizaciones, tales moléculas de unión a ASCT2 son los ADC de ASCT2.

Por lo tanto, la presente divulgación también proporciona un ADC que comprende un anticuerpo anti-ASCT2 divulgado en el presente documento, que comprende adicionalmente al menos un agente citotóxico. En algunos aspectos, el ADC comprende adicionalmente al menos un espaciador opcional. En algunos aspectos, el al menos un espaciador es un espaciador peptídico. En algunos aspectos, el al menos un espaciador es un espaciador no peptídico.

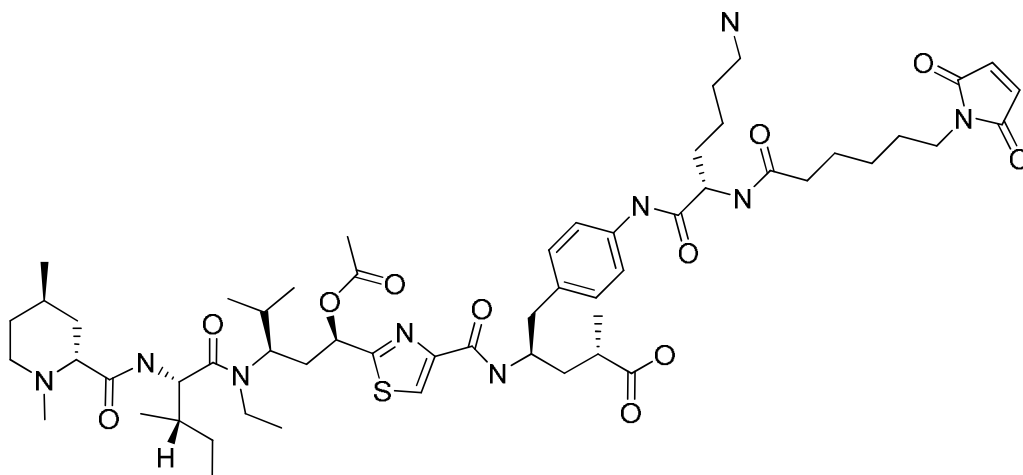
El agente citotóxico o citotoxina puede ser cualquier molécula conocida en la técnica que inhibe o impide la función de células y/o provoca la destrucción de células (muerte celular), y/o ejerce efectos antineoplásicos/antiproliferativos. Se sabe que varias clases de agentes citotóxicos tienen una utilidad potencial en las moléculas de ADC. Estos 25 incluyen, pero sin limitación, amanitinas, auristatinas, daunomicinas, doxorubicinas, duocarmicinas, dolastatinas, enediyinas, lexitropsinas, taxanos, puromicinas, maitansinoides, alcaloides de la vinca, tubulisininas y pirrolobenzodiazepinas (las PBD). Ejemplos de tales agentes citotóxicos son AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, toptotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, dolastatina-10, echinomocina, combretatestatina, chaliceamicina, maitansina, DM-1, vinblastina, metotrexato y netropsina, y derivados y análogos de los mismos. Se puede encontrar una divulgación adicional con respecto a las citotoxinas adecuadas para su uso en los ADC, por ejemplo, en las Solicitudes de Patente Internacional N.º de publicación WO 2015/155345 y WO 2015/157592.

En una realización, el agente citotóxico es tubulicina o un derivado de tubulicina. Tubulicina A tiene la siguiente estructura química:

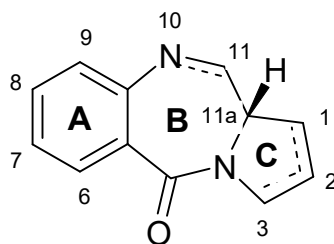


35 Las tubulisininas son miembros de una clase de productos naturales aislados de especies mixobacterianas (Sasse *et al.*, *J. Antibiot.* 53:879-885 (2000)). Como agentes de interacción con el citoesqueleto, las tubulisininas son toxinas mitóticas que inhiben la polimerización de la tubulina y conducen a la detención del ciclo celular y apoptosis (Steinmetz *et al.*, *Chem. Int. Ed.* 43:4888-4892 (2004); Khalil *et al.*, *Chem. Biochem.* 7:678-683 (2006); Kaur *et al.*, *Biochem. J.* 396: 235-242 (2006)). Como se usa en el presente documento, el término "tubulicina" se refiere tanto colectiva como individualmente a las tubulisininas de origen natural, y a análogos y derivados de tubulisininas. Se divulgan ejemplos ilustrativos de tubulisininas, por ejemplo, en los documentos WO2004005326A2, WO2012019123A1, WO2009134279A1, WO2009055562A1, WO2004005327A1, US7776841, US7754885, US20100240701, US7816377, US20110021568 y US20110263650. Ha de entenderse que tales derivados incluyen, 45 por ejemplo, profármacos de tubulicina o tubulisininas que incluyen uno o más grupos de protección o protectores, una o más fracciones de unión.

En determinados aspectos, la tubulicina es tubulicina 1508, también denominada en el presente documento "AZ1508" y se describe con más detalle en el documento WO 2015157594, que tiene la siguiente estructura:



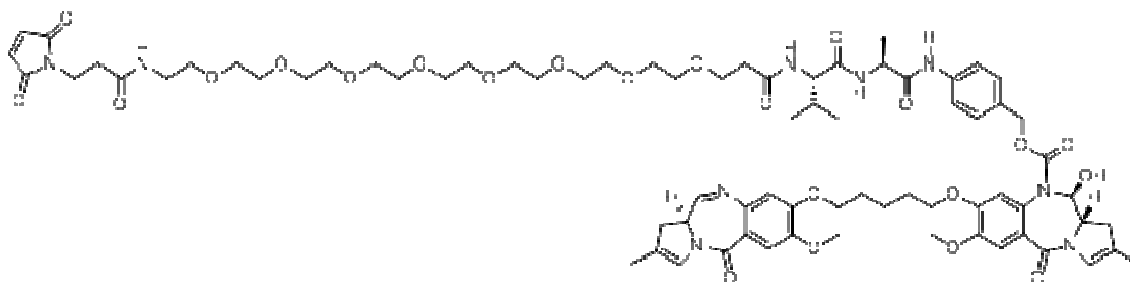
En otra realización, el agente citotóxico puede ser una pirrolobenzodiazepina (PBD) o un derivado de PBD. La PBD se transloca al núcleo, donde se entrecruza con el ADN, impidiendo la replicación durante la mitosis, dañando el ADN induciendo rupturas en una sola cadena y, posteriormente, conduciendo a la apoptosis. Algunas PBD tienen la capacidad de reconocer y unirse a secuencias específicas de ADN; la secuencia preferente es PuGPu. Las PBD tienen la estructura general:



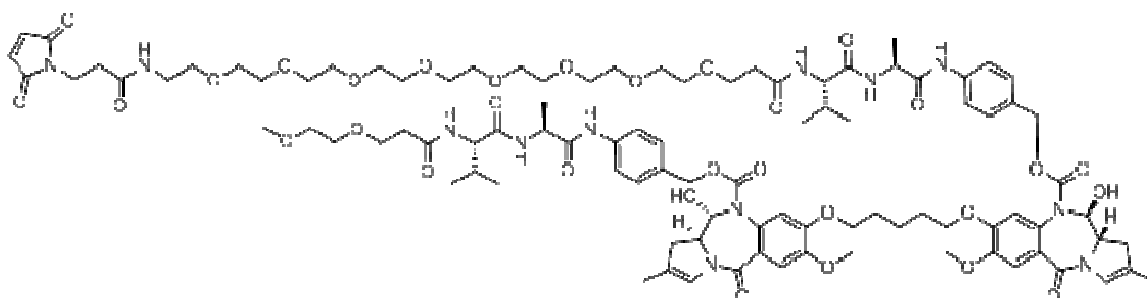
Las PBD difieren en el número, tipo y posición de los sustituyentes, tanto en sus anillos aromáticos A como en los anillos pirrolo C, y en el grado de saturación del anillo C. En el anillo B hay una imina (N=C), una carbinolamina (NH-CH(OH)) o un metil éter de carbinolamina (NH-CH(OMe)) en la posición N10-C11, que es el centro electrófilo responsable de la alquilación del ADN. Todos los productos naturales conocidos tienen una configuración (S) en la posición quiral C11a que les proporciona un giro a la derecha cuando se ven desde el anillo C hacia el anillo A. Esto les da la forma tridimensional apropiada para la isohelicidad con el surco menor del ADN-B, lo que conduce a un ajuste ceñido en el sitio de unión (Kohn, *In Antibiotics III*. Springer-Verlag, Nueva York, pág. 3-11 (1975); Hurley y Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.*, 19, 230-237 (1986)). Su capacidad para formar un aducto en el surco menor les permite interferir con el procesamiento del ADN, de ahí su uso como agentes antitumorales.

El primer antibiótico antitumoral de PBD, la antramizina, se descubrió en 1965 (Leimgruber *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 87:5793-5795 (1965); Leimgruber *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 87:5791-5793 (1965)). Desde entonces, se ha informado de varias PBD de origen natural y se han desarrollado más de 10 rutas sintéticas para una diversidad de análogos (Thurston *et al.*, *Chem. Rev.* 1994:433-465 (1994); Antonow, D. y Thurston, D.E., *Chem. Rev.* 111:2815-2864 (2011)). Los miembros de la familia incluyen abeimicina (Hochlowski *et al.*, *J. Antibiotics* 40:145-148 (1987)), chicamicina (Konishi *et al.*, *J. Antibiotics* 37:200-206 (1984)), DC-81 (Patente Japonesa 58-180 487; Thurston *et al.*, *Chem. Brit.* 26:767-772 (1990); Bose *et al.*, *Tetrahedron* 48:751-758 (1992)), mazetramazina (Kuminoto *et al.*, *J. Antibiotics* 33:665-667 (1980)), neotramicinas A y B (Takeuchi *et al.*, *J. Antibiotics* 29:93-96 (1976)), porotramicina (Tsunakawa *et al.*, *J. Antibiotics* 41:1366-1373 (1988)), protracarcina (Shimizu *et al.*, *J. Antibiotics* 29:2492-2503 (1982); Langley y Thurston, *J. Org. Chem.* 52:91-97 (1987)), sibanomicina (DC-102) (Hara *et al.*, *J. Antibiotics* 41:702-704 (1988); Itoh *et al.*, *J. Antibiotics* 41:1281-1284 (1988)), sibiromicina (Leber *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 110:2992-2993 (1988)) y tomamicina (Arima *et al.*, *J. Antibiotics* 25:437-444 (1972)). Las PBD y los ADC que los comprenden también se describen en las Solicitudes de Patente Internacional N.º de Publicación WO 2015/155345 y WO 2015/157592, incorporadas por referencia en su totalidad en el presente documento.

En determinados aspectos, la PBD es PBD 3249, también denominada en el presente documento "SG3249" y descrita con más detalle en el documento WO 2014/057074, que tiene la siguiente estructura:



En determinados aspectos, la PBD es PBD 3315, también denominada en el presente documento "SG3315" y descrita con más detalle en el documento WO 2015/052322, que tiene la siguiente estructura:



- 5 Los anticuerpos anti-ASCT2 y fragmentos de antígeno de los mismos, divulgados en el presente documento, pueden conjugarse con agentes heterólogos utilizando métodos de conjugación específicos de sitio o no específicos de sitio. En algunos aspectos, el ADC comprende una, dos, tres, cuatro o más fracciones terapéuticas. En algunos aspectos, todas las fracciones terapéuticas son las mismas.

10 Las estrategias de conjugación convencionales para anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se basan en la conjugación aleatoria de la carga útil al anticuerpo o fragmento, a través de lisinas o cisteínas. Por consiguiente, en algunos aspectos el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, se conjuga aleatoriamente con un agente, por ejemplo, mediante reducción parcial del anticuerpo o fragmento, seguido de la reacción con un agente deseado, con o sin una fracción enlazadora unida. El anticuerpo o fragmento puede reducirse utilizando DTT o un agente reductor similar. El agente con o sin una fracción enlazadora unida puede a continuación añadirse en un exceso molar al anticuerpo reducido o fragmento en presencia de DMSO. Después de la conjugación, se puede añadir un exceso de cisteína libre para inactivar el agente que no ha reaccionado. Después, la mezcla de reacción puede purificarse e intercambiarse con tampón en PBS.

15 En otros aspectos, la conjugación específica de sitio de fracciones terapéuticas con anticuerpos utilizando restos de aminoácido reactivos en posiciones específicas, produce preparaciones de ADC homogéneas con una estequiometría uniforme. La conjugación específica de sitio puede ser a través de una cisteína, resto o un aminoácido no natural. En una realización, el agente citotóxico o de formación de imágenes se conjuga con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a través de al menos un resto de cisteína. En algunos aspectos, cada fracción terapéutica está conjugada químicamente con la cadena lateral de un aminoácido en una posición de Kabat específica en la región Fc. En algunas realizaciones, el agente citotóxico o de formación de imágenes se conjuga con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a través de una sustitución de cisteína de al menos una de las posiciones 239, 248, 254, 273, 279, 282, 284, 286, 287, 289, 297, 298, 312, 324, 326, 330, 335, 337, 339, 350, 355, 356, 359, 360, 361, 375, 383, 384, 389, 398, 400, 413, 415, 418, 422, 440, 441, 442, 443 y 446, en las que la numeración corresponde al índice de la UE en Kabat. En algunos aspectos, las posiciones de Kabat específicas son 239, 442, o ambas. En algunos aspectos, las posiciones específicas son la posición de Kabat 442, una inserción de aminoácido entre las posiciones de Kabat 239 y 240, o ambas. En algunos aspectos, el agente se conjuga con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a través de una unión tiol-maleimida. En algunos aspectos, la cadena lateral de aminoácido es una cadena lateral sulfhidrilo.

20 En una realización, la molécula de unión a ASCT2, por ejemplo, un ADC de ASCT2, un anticuerpo anti-ASCT2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, suministra una carga útil citotóxica a las células que expresan ASCT2, e inhibe o suprime la proliferación en al menos el 10 %, o al menos el 20 %, o al menos el 30 %, o al menos el 40 %, o al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70 %, o al menos el 80 %, o al menos el 90 % o aproximadamente el 100 %. Puede ensayarse la proliferación celular utilizando técnicas reconocidas en la técnica que miden la tasa de división celular y/o la fracción de células dentro de una población celular que experimenta división celular, y/o la tasa de pérdida de células de una población celular debido a diferenciación terminal o muerte celular (por ejemplo, incorporación de timidina).

**VI. Polinucleótidos que codifican moléculas de unión a ASCT2 y expresión de los mismos**

5 La presente divulgación proporciona polinucleótidos que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido que se une específicamente a ASCT2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Más específicamente, la invención proporciona un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-ASCT2 de la invención o codifica un fragmento de unión a antígeno de tal anticuerpo. Los polinucleótidos de la invención pueden estar en forma de ARN o en forma de ADN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético; y puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la cadena codificante o la cadena no codificante (antisentido).

10 En determinadas realizaciones, se puede aislar un polinucleótido. En determinadas realizaciones, un polinucleótido puede estar sustancialmente puro. En determinadas realizaciones, un polinucleótido puede ser ADNc u obtenerse de ADNc. En determinadas realizaciones, un polinucleótido se puede producir de forma recombinante. En determinadas realizaciones, un polinucleótido puede comprender la secuencia codificante del polipéptido maduro fusionada en la misma fase de lectura a un polinucleótido que ayuda, por ejemplo, a la expresión y secreción de un polipéptido de una célula hospedadora (por ejemplo, una secuencia líder que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido a partir de la célula). El polipéptido que tiene una secuencia líder es una preproteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula hospedadora, para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una proproteína de unión a ASCT2 que es la proteína madura más restos de aminoácidos 5' adicionales.

20 La divulgación proporciona adicionalmente un polinucleótido aislado que comprende un ácido nucleico que codifica un VH de anticuerpo, en el que el VH comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, la SEQ ID NO: 3, la SEQ ID NO: 5 y la SEQ ID NO: 7.

25 La divulgación proporciona adicionalmente un polinucleótido aislado que comprende un ácido nucleico que codifica un VH de anticuerpo, en el que el VH comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 6 y la SEQ ID NO: 8.

30 La divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende un ácido nucleico que codifica un VH de anticuerpo, en el que el VH comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 1 y un ácido nucleico que codifica un VL de anticuerpo, en el que el VL comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 2. La divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende un ácido nucleico que codifica un VH de anticuerpo, en el que el VH comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 3 y un ácido nucleico que codifica un VL de anticuerpo, en el que el VL comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 4. La divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende un ácido nucleico que codifica un VH de anticuerpo, en el que el VH comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 5 y un ácido nucleico que codifica un VL de anticuerpo, en el que el VL comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 6. La divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende un ácido nucleico que codifica un VH de anticuerpo, en el que el VH comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 7 y un ácido nucleico que codifica un VL de anticuerpo, en el que el VL comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 8.

50 En determinados aspectos, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un VH o VL codificado por un polinucleótido como se describe anteriormente, puede unirse específicamente a ASCT2, por ejemplo, a ASCT2 humana o de mono cinomolgo. En determinados casos, tal anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede unirse específicamente al mismo epítopo que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende el VH y VL de 17c10 o 1e8. En determinados aspectos, la divulgación proporciona un polinucleótido o combinación de polinucleótidos, que codifica una molécula de unión, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a ASCT2.

55 Se proporciona adicionalmente un vector que comprende un polinucleótido como se describe anteriormente. Los vectores adecuados se describen en el presente documento y son conocidos para el experto en la materia.

En determinados aspectos, la divulgación proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido o un vector, como se describe anteriormente, que comprende adicionalmente, de forma opcional, uno o más vehículos, diluyentes, excipientes u otros aditivos.

En una composición de polinucleótido como se describe anteriormente, el polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un VH y el polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un VL pueden residir en un único vector, o pueden estar en vectores distintos. Por consiguiente, la divulgación proporciona uno o más vectores que comprenden la composición de polinucleótido descrita anteriormente.

5 La presente divulgación proporciona adicionalmente una célula hospedadora, que comprende un polinucleótido, una composición de polinucleótido o un vector, como se proporciona anteriormente, donde la célula huésped puede, en algunos casos, expresar un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a ASCT2. Dicha célula hospedadora se puede utilizar en un método de preparación de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, como se proporciona en el presente documento, donde el método incluye (a) cultivar la  
10 célula huésped y (b) aislar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo expresado a partir de la célula hospedadora.

En determinadas realizaciones, los polinucleótidos comprenden la secuencia codificante para el polipéptido de unión a ASCT2 maduro, por ejemplo, un anticuerpo anti-ASCT2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, fusionado en la misma fase de lectura a una secuencia de marcador que permite, por ejemplo, la purificación del polipéptido  
15 codificado. Por ejemplo, la secuencia de marcador puede ser una etiqueta de hexahistidina suministrada por un vector pQE-9, para hacer posible la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador, en el caso de un hospedador bacteriano, o la secuencia de marcador puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) procedente de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe, cuando se utiliza un hospedador mamífero (por ejemplo, células COS-7).

20 También se proporcionan variantes de polinucleótido. Las variantes de polinucleótido pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o en ambas. En algunas realizaciones, las variantes de polinucleótido contienen alteraciones que producen sustituciones que no producen un cambio de aminoácido, adiciones o deleciones, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En algunas realizaciones, las variantes de polinucleótido se producen mediante sustituciones que no producen un cambio de  
25 aminoácido, debido a la degeneración del código genético. Pueden producirse variantes de polinucleótido por una diversidad de motivos, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un hospedador particular (cambiar codones en el ARNm humano a los preferentes para un hospedador bacteriano, tal como *E. coli*). También se proporcionan vectores y células que comprenden los polinucleótidos descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, una secuencia de ADN que codifica una molécula de unión a ASCT2 se puede construir mediante síntesis química utilizando un sintetizador de oligonucleótidos. Dichos oligonucleótidos pueden diseñarse basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido deseado y seleccionando los codones que están favorecidos en la célula hospedadora en la que se producirá el polipéptido recombinante de interés. Pueden aplicarse métodos convencionales para sintetizar una secuencia de polinucleótido aislada que codifica un polipéptido de interés aislado. Por ejemplo, puede utilizarse una secuencia de aminoácidos completa para construir un gen  
35 retrotraducido. Adicionalmente, puede sintetizarse un oligómero de ADN que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido aislado particular. Por ejemplo, pueden sintetizarse varios oligonucleótidos pequeños que codifican porciones del polipéptido deseado y después ligarse. Los oligonucleótidos individuales contienen normalmente protuberancias 5' o 3' para el ensamblaje complementario.

Una vez ensambladas (mediante síntesis, mutagénesis dirigida u otro método), las secuencias de polinucleótido que codifican un polipéptido aislado particular de interés se pueden insertar en un vector de expresión y unirse operativamente a una secuencia de control de la expresión apropiada para la expresión de la proteína en un hospedador deseado. El ensamblaje apropiado se puede confirmar, por ejemplo, mediante secuenciación de nucleótidos, mapeo de restricción y/o expresión de un polipéptido biológicamente activo en un hospedador adecuado. Para obtener altos niveles de expresión de un gen transfectado en un hospedador, el gen puede unirse  
40 operativamente o asociarse con secuencias de control transcripcionales y traduccionales de la expresión que sean funcionales en el hospedador de expresión elegido.

En determinadas realizaciones, se utilizan vectores de expresión recombinante para amplificar y expresar el ADN que codifica anticuerpos anti-ASCT2 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Los vectores de expresión recombinante son construcciones de ADN replicables que tienen fragmentos de ADN sintéticos u obtenidos de  
50 ADNc, que codifican una cadena polipeptídica de un anticuerpo anti-ASCT2 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, unidos operativamente a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados, procedentes de genes de mamífero, microbianos, víricos o de insecto. Una unidad transcripcional comprende en general un ensamblaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión génica, por ejemplo, promotores o potenciadores transcripcionales, (2) una secuencia estructural o codificante que se transcribe a ARNm y se traduce a una proteína, y (3) secuencias de iniciación y terminación de la transcripción y la traducción apropiadas, como se describe en detalle en el presente documento. Dichos elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. De forma adicional, se puede incorporar la capacidad de replicación en un hospedador, habitualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes. Las regiones de ADN están operativamente unidas cuando están  
55 relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal (líder de secreción) está unido operativamente al ADN de un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del

polipéptido; un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está situado de modo que se permita la traducción. Los elementos estructurales destinados para su uso en sistemas de expresión en levaduras incluyen una secuencia líder que permite la secreción extracelular de proteína traducida por una célula hospedadora. Como alternativa, cuando se expresa una proteína recombinante sin una secuencia líder o de transporte, la proteína puede incluir un resto de metionina N-terminal. Este resto puede, de forma opcional, escindirse posteriormente de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

La elección de la secuencia de control de la expresión y del vector de expresión dependerá de la elección del hospedador. Puede emplearse una amplia diversidad de combinaciones de hospedador/vector de expresión. Los vectores de expresión útiles para hospedadores eucariotas incluyen, por ejemplo, vectores que comprenden secuencias de control de la expresión de SV40, virus del papiloma bovino, adenovirus y citomegalovirus. Los vectores de expresión útiles para hospedadores bacterianos incluyen plásmidos bacterianos conocidos, tales como plásmidos de *E. coli*, incluyendo pCR 1, pBR322, pMB9 y sus derivados, plásmidos para una variedad de hospedadores más amplia, tales como M13 y fagos filamentosos de ADN monocatenario.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de una molécula de unión a ASCT2 incluyen células procariotas, de levaduras, de insecto o de eucariotas superiores, bajo el control de promotores apropiados. Las procariotas incluyen organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo *E. coli* o bacilos. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas de origen mamífero, como se describe en el presente documento. También pueden emplearse sistemas de traducción sin células. Se puede encontrar información adicional con respecto a métodos de producción de proteínas, incluyendo producción de anticuerpos, por ejemplo en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2008/0187954, las Patentes de Estados Unidos N.º 6,413,746 y 6,660,501, y la publicación de Patente Internacional N.º WO 04009823.

Además, se pueden emplear de forma ventajosa diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o de insecto para expresar las moléculas de unión a ASCT2 recombinantes. Puede realizarse la expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero debido a que tales proteínas se pliegan generalmente de manera correcta, se modifican apropiadamente y son completamente funcionales. Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen HEK-293 y HEK-293T, las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman, *Cell* 23:175 (1981), y otras líneas celulares incluyendo, por ejemplo, las células L, las líneas celulares C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados unidos al gen a expresar, y otras secuencias no transcritas flanqueantes 5' o 3', y secuencias no traducidas 5' o 3', tales como los sitios de unión al ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios de corte y empalme donantes y aceptores, y secuencias de terminación de la transcripción. Luckow y Summers, *BioTechnology* 6:47 (1988), han realizado una revisión de los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto.

Las moléculas de unión a ASCT2 producidas por un hospedador transformado se pueden purificar de acuerdo con cualquier método adecuado. Dichos métodos convencionales incluyen la cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, de afinidad y en columna por tamaño), la centrifugación, la solubilidad diferencial o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Pueden unirse a la proteína etiquetas de afinidad tales como hexahistidina, dominio de unión a maltosa, la secuencia de la proteína de la cubierta del virus de la gripe y glutatión-S-transferasa, para permitir una fácil purificación mediante el paso por una columna de afinidad adecuada. También pueden caracterizarse físicamente proteínas aisladas usando técnicas tales como proteólisis, resonancia magnética nuclear o cristalografía de rayos X.

Por ejemplo, pueden concentrarse en primer lugar sobrenadantes de sistemas que secretan proteína recombinante en medios de cultivo utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, se puede aplicar el concentrado a una matriz de purificación adecuada. Como alternativa, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o un sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser de acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos empleados comúnmente en la purificación de proteínas. Como alternativa, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Para finalizar, para purificar adicionalmente una molécula de unión a ASCT2 pueden emplearse una o más etapas de cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) empleando medios de RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo colgantes y otros grupos alifáticos. También pueden emplearse algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

Una molécula de unión a ASCT2 recombinante producida en cultivo bacteriano se puede aislar, por ejemplo, mediante extracción inicial de sedimentos de células, seguido de una o más etapas de concentración, desestabilización salina, de intercambio de iones acuoso o de cromatografía por exclusión de tamaño. Puede emplearse cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para las etapas de purificación finales. Las células microbianas empleadas en la expresión de una proteína recombinante se pueden romper mediante cualquier

método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, tratamiento con ultrasonido, rotura mecánica o el uso de agentes de lisado celular.

Métodos conocidos en la técnica para purificar anticuerpos y otras proteínas también incluyen, por ejemplo, los descritos en las publicaciones de patente de Estados Unidos N.º 2008/0312425, 2008/0177048 y 2009/0187005.

5 **VII. Composiciones farmacéuticas y métodos de administración**

Los métodos para preparar y administrar a un sujeto que lo necesite las moléculas de unión a ASCT2 proporcionadas en el presente documento son conocidos para los expertos en la materia, o estos pueden determinarlos fácilmente. La vía de administración de la molécula de unión a ASCT2 puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye, por ejemplo, la administración intravenosa, intrarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Aunque se contemplan claramente que todas estas formas de administración están dentro del alcance de la invención, otro ejemplo de una forma de administración sería una solución para inyección, en particular para goteo o inyección intravenosa o intrarterial. Normalmente, una composición farmacéutica adecuada puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), de forma opcional un agente estabilizante (por ejemplo, albúmina humana), etc. En otros métodos compatibles con las enseñanzas del presente documento, se pueden suministrar las moléculas de unión a ASCT2 proporcionadas en el presente documento directamente al sitio de la población celular perjudicial, aumentando de esta manera la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico. En una realización, la administración es directamente a las vías respiratorias, por ejemplo, por inhalación o administración intranasal.

Como se analiza en el presente documento, las moléculas de unión a ASCT2 proporcionadas en el presente documento pueden administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo* de enfermedades o trastornos caracterizados por la sobreexpresión de ASCT2, tales como cáncer colorrectal, CCECC, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, melanoma, cáncer de endometrio, cáncer hemático (LMA, MM, LDLBG) y cánceres que comprenden las CMC. En este sentido, se apreciará que las moléculas de unión divulgadas se pueden formular de manera que se facilite la administración y se provoque la estabilidad del agente activo. Las composiciones farmacéuticas en conformidad con la presente invención pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable, no tóxico y estéril, tal como solución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. Para los fines de la presente solicitud, una cantidad farmacéuticamente eficaz de una molécula de unión a ASCT2, significa a una cantidad suficiente para lograr una unión eficaz a una diana y para lograr un beneficio, por ejemplo, para mejorar los síntomas de una enfermedad o afección, o para detectar una sustancia o una célula. Se describen formulaciones adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos divulgados en el presente documento en Remington's Pharmaceutical Sciences, 22ª ed., Ed. Lloyd V. Allen, Jr. (2012).

Determinadas composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden administrarse por vía oral en una forma farmacéutica aceptable incluyendo, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, suspensiones acuosas o disoluciones. Determinadas composiciones farmacéuticas pueden administrarse también mediante aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones pueden prepararse como disoluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

La cantidad de una molécula de unión a ASCT2 que puede combinarse con materiales de vehículo para producir una forma farmacéutica unitaria variará dependiendo del sujeto tratado y el modo de administración particular. La composición puede administrarse como una única dosis, como múltiples dosis o en una infusión a lo largo de un periodo de tiempo establecido. Además, las pautas posológicas pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada.

En conformidad con el alcance de la presente divulgación, se pueden administrar moléculas de unión a ASCT2 a un ser humano u otro animal en conformidad con los métodos de tratamiento mencionados anteriormente, en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico. Las moléculas de unión a ASCT2 proporcionadas en el presente documento se pueden administrar a tal ser humano u otro animal en una forma farmacéutica convencional, preparada combinando una molécula de unión a ASCT2 de la invención con un vehículo o diluyente convencional farmacéuticamente aceptable de acuerdo con técnicas conocidas. La forma y el carácter del vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable pueden estar estipulados por la cantidad de principio activo con el que se va a combinar, la vía de administración y otras variables muy conocidas. También se puede utilizar un cóctel que comprende una o más especies de moléculas de unión a ASCT2, por ejemplo, los ADC de ASCT2, anticuerpos anti-ASCT2 o fragmentos de unión a antígeno, variantes o derivados de los mismos, de la invención.

Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se entiende una cantidad de una molécula de unión a ASCT2 que, cuando se administra, provoca una respuesta terapéutica positiva con respecto al tratamiento de un paciente con una enfermedad o afección a tratar.

Las dosis terapéuticamente eficaces de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de enfermedades o trastornos en los cuales se sobreexpresa ASCT2, tales como determinados cánceres, varían



dependiendo de muchos factores distintos, que incluyen los medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, de si el paciente es un ser humano o un animal y de otros medicamentos administrados. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero también pueden tratarse mamíferos no humanos, incluyendo mamíferos transgénicos. Se pueden titular las dosificaciones de tratamiento utilizando métodos establecidos conocidos por los expertos en la materia, para optimizar la seguridad y eficacia.

Con la presente divulgación, el experto en la materia determinará fácilmente la cantidad de al menos una molécula de unión a ASCT2 a administrar, sin una experimentación excesiva. Los factores que influyen en el modo de administración y la cantidad respectiva de al menos una molécula de unión a ASCT2 incluyen, por sin limitación, la gravedad de la enfermedad, los antecedentes de la enfermedad, y la edad, talla, peso, salud y estado físico del individuo que se somete a terapia. De forma similar, la cantidad de una molécula de unión a ASCT2 a administrar dependerá del modo de administración y de si el sujeto recibirá una dosis única o múltiples dosis de este agente.

La presente divulgación también proporciona el uso de una molécula de unión a ASCT2, por ejemplo, un ADC de ASCT2, un anticuerpo anti-ASCT2 o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la sobreexpresión de ASCT2, por ejemplo, cáncer colorrectal, CCECC, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas o un cáncer hemático.

La presente divulgación también proporciona el uso de una molécula de unión a ASCT2, por ejemplo, un ADC de ASCT2, un anticuerpo anti-ASCT2 o un fragmento de unión a antígeno, variante o derivado del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por la sobreexpresión de ASCT2, por ejemplo, cáncer colorrectal, CCECC, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas o un cáncer hemático.

### VIII. Diagnóstico

La presente divulgación proporciona adicionalmente un método de diagnóstico útil durante el diagnóstico de enfermedades caracterizadas por la sobreexpresión de ASCT2, tales como determinados cánceres, que implica medir el nivel de expresión de ASCT2 en células o tejido de un individuo y comparar el nivel de expresión medido con una expresión de ASCT2 patrón en células o tejido normales, por lo que un aumento en el nivel de expresión en comparación con el patrón es indicativo de un trastorno tratable por una molécula de unión a ASCT2 proporcionada en el presente documento.

Las moléculas de unión a ASCT2 proporcionadas en el presente documento se pueden utilizar para ensayar los niveles de proteína ASCT2 en una muestra biológica, utilizando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos por los expertos en la materia. Véase Jalkanen *et al.*, *J. Cell Biol.* 105:3087-3096 (1987); Jalkanen, *et al.*, *J. Cell Biol.* 101:976-985 (1985). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión de la proteína ASCT2 incluyen inmunoensayos, tales como ELISA, inmunoprecipitación o transferencia de Western.

Por "ensayar el nivel de expresión de un polipéptido ASCT2" se entiende medir o estimar de forma cualitativa o cuantitativa el nivel de polipéptido ASCT2 en una primera muestra biológica, de forma directa (por ejemplo, determinando o estimando el nivel de proteína absoluto) o relativa (por ejemplo, comparando con el nivel de polipéptido asociado con enfermedad en una segunda muestra biológica). El nivel de expresión del polipéptido ASCT2 en la primera muestra biológica puede medirse o estimarse, y compararse con un nivel de polipéptido ASCT2 patrón, tomándose el nivel patrón de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o determinándose promediando los niveles de una población de individuos que no tienen el trastorno. Como se apreciará en la técnica, una vez que se conoce el nivel de polipéptido ASCT2 "patrón", puede utilizarse repetidamente como patrón para la comparación.

Por "muestra biológica" se entiende cualquier muestra biológica obtenida de un individuo, línea celular, cultivo de tejido u otra fuente de células que potencialmente expresan ASCT2. Se conocen bien en la técnica los métodos para obtener biopsias de tejido y fluidos corporales de mamíferos.

### IX. Kits que comprenden moléculas de unión a ASCT2

Esta invención proporciona adicionalmente kits que comprenden una molécula de unión a ASCT2 de la invención y que pueden utilizarse para realizar los métodos descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, un kit comprende al menos un anticuerpo anti-ASCT2 purificado o un fragmento de unión a antígeno del mismo en uno o más recipientes. En determinadas realizaciones, un kit comprende al menos un ADC de ASCT2 purificado en uno o más recipientes. En algunas realizaciones, los kits contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar un ensayo de detección, incluyendo todos los controles, instrucciones para realizar los ensayos y cualquier programa informático necesario para el análisis y la presentación de los resultados. Un experto en la materia reconocerá fácilmente que las moléculas de unión a ASCT2 divulgadas pueden incorporarse fácilmente en uno de los formatos de kit establecidos que son bien conocidos en la técnica.

## X. Inmunoensayos

Las moléculas de unión a ASCT2 proporcionadas en el presente documento se pueden utilizar en ensayos de unión inmunoespecífica mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que pueden utilizarse incluyen, pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que usan técnicas tales como transferencia de Western, RIA, ELISA, ELISPOT, inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones con precipitina, reacciones con precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Dichos ensayos son habituales y muy conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, (1994) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1.

Las moléculas de unión a ASCT2 proporcionadas en el presente documento se pueden emplear de forma histológica, como en inmunofluorescencia, microscopía inmunoelectrónica o ensayos no inmunológicos, por ejemplo, para la detección *in situ* de ASCT2, o variantes conservadas o fragmentos de péptido de la misma. La detección *in situ* se puede lograr extrayendo una muestra de ensayo histológica de un paciente y aplicando a esta una molécula de unión a ASCT2 marcada, por ejemplo, aplicada recubriendo la molécula de unión a ASCT2 marcada sobre una muestra biológica. A través del uso de tal procedimiento, es posible determinar no solo la presencia de ASCT2, o variantes conservadas o fragmentos peptídicos, sino también su distribución en el tejido examinado. Utilizando la presente invención, los expertos en la materia advertirán fácilmente que se puede modificar cualquiera de una amplia diversidad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción) para conseguir tal detección *in situ*.

La actividad de unión de un lote dado de una molécula de unión a ASCT2 se puede determinar de acuerdo con métodos bien conocidos. Los expertos en la materia serán capaces de determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinación empleando experimentación rutinaria.

Los métodos y reactivos adecuados para la determinación de las características de unión de una molécula de unión a ASCT2 aislada son conocidos en la técnica y/o están disponibles en el mercado. Están disponibles en el mercado los equipos y programas informáticos diseñados para tales análisis cinéticos (por ejemplo, BIAcore®, programa informático BIAevaluation®, GE Healthcare; programa informático KINEXA®, Sapidyne Instruments).

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las habilidades en la técnica. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook *et al.*, ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volúmenes I y II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis *et al.* Patente de Estados Unidos N.º 4,683,195; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; el tratado, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu *et al.*, eds., *Methods In Enzymology*, Vol. 154 y 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV; *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); y en Ausubel *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.).

Los principios generales del diseño técnico de anticuerpos se exponen en Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2ª ed.; Oxford Univ. Press). Los principios generales de modificación por ingeniería de proteínas se exponen en Rickwood *et al.*, eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.). Los principios generales de anticuerpos y unión de anticuerpo-hapteno se exponen en: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2ª ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); y Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman y Hall, Nueva York, N.Y.). Adicionalmente, se siguen generalmente métodos convencionales en inmunología conocidos en la técnica y no descritos específicamente como en *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Nueva York; Stites *et al.*, eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8ª ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) y Mishell y Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman y Co., NY). Freeman and Co., NY).

Los trabajos de referencia convencionales que exponen los principios generales de inmunología incluyen *Current Protocols in Immunology*, John Wiley y Sons, Nueva York; Klein (1982) J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination* (John Wiley & Sons, NY); Kennett *et al.*, eds. (1980) *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses* (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" en *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, ed. Burden *et al.*, (Elsevier, Amsterdam); Goldsby *et al.*, eds. (2000) *Kuby Immunology* (4ª ed.; H. Freeman y Co.); Roitt *et al.* (2001) *Immunology* (6ª ed.; Londres: Mosby); Abbas *et al.* (2005) *Cellular and Molecular Immunology* (5ª ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann y Dubel (2001) *Antibody Engineering* (Springer Verlag); Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning*

A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach y Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press).

5 Todas las referencias citadas en la presente divulgación se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Además, se incorpora por referencia en el presente documento cualquiera de las instrucciones o catálogos del fabricante para cualquiera de los productos citados o mencionados. Los documentos incorporados al presente texto por referencia o cualquier enseñanza en los mismos, pueden usarse en la práctica de la presente invención. Los documentos incorporados por referencia en el presente texto no son una admisión de que sean técnica anterior.

10 **EJEMPLOS**

Los siguientes Ejemplos se presentan a modo de ilustración y no a modo de limitación.

15 Pueden definirse adicionalmente realizaciones de la presente divulgación mediante referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que describen en detalle la preparación de determinados anticuerpos de la presente divulgación y métodos para utilizar los anticuerpos de la presente divulgación. Resultará evidente para los expertos en la materia que pueden ponerse en práctica muchas modificaciones, tanto de materiales como de métodos, sin apartarse del alcance de la presente divulgación.

**Ejemplo 1. Expresión de ASCT2 en tejidos humanos normales y cancerosos**

*Expresión de proteína ASCT2 en tejido normal y tumoral analizada por IHQ*

20 Para evaluar la expresión de proteína de ASCT2, se llevó a cabo IHQ en cortes de tejidos humanos normales y tumorales humanos fijados con formaldehído. Después del tratamiento de obtención de antígeno con tampón de citrato (pH=6.0), los tejidos se analizaron con anticuerpo policlonal de conejo anti-ASCT2 (EMD Millipore, Billerica, MA; N.º de cat. ABN73), siguiendo el protocolo del fabricante. La optimización del protocolo se realizó utilizando la línea celular HT29 como control positivo y hepatocitos humanos primarios como control negativo.

En tejidos normales, no se observó tinción para ASCT2 en hígado, corazón, neumocitos, glomérulos y cerebro.

25 *Expresión de ASCT2 en tumores humanos*

30 La expresión de ASCT2 se evaluó mediante IHQ en diversos tejidos cancerosos. En tumores sólidos se observó una fuerte expresión de ASCT2 en membrana, incluyendo carcinoma de colon, carcinoma de células escamosas de pulmón, cáncer de cabeza y cuello y tejidos de cáncer de próstata, y en cánceres hemáticos tales como LMA, MM y DLBCL. Además, se observó una alta expresión de ASCT2 en tejidos de cáncer de endometrio ovárico y en tejidos de melanoma. La Tabla 2 proporciona a continuación un resumen de la expresión de ASCT2 en tejidos cancerosos humanos.

**Tabla 2**  
**Expresión de ASCT2 en tumores humanos**

	Total	Neg*	Baja	Media	Alta	Núcleo posi-tivo	Tasa posi-tiva (%)
CCNM CCE de pulmón	5	0	1	1	3	5	100
CCNM adeno-carcinoma de pulmón	5	3	0	2	0	2	40
CCNM indiferenciado de pulmón	2	1	0	0	1	1	50

	Total	Neg*	Baja	Media	Alta	Núcleo posi-tivo	Tasa posi-tiva (%)
Ductal infil-trante de mama	10	8	1	1	0	2	20
Lobuli-llar infil-trante de mama	2	2	0	0	0	0	0
Adeno seroso y seroso papilar de ovario	8	5	1	1	1	3	38
Endome-troide de ovario	4	1	0	0	3	3	75
Colon	11	0	1	3	7	11	100
Melanoma (metá-stasis)	11	4	2	2	3	7	64
Próstata	12	0	0	1	11	12	100
Cabeza y cuello	10	0	1	2	7	10	100
MM	15	0	0	0	15	15	100
LMA	16	0	4	0	12	16	100
LDLBG	128	6	20	32	70	122	95.3

5 Se observó expresión de ASCT2 en células madre de cáncer de LMA y MM. La ASCT2 en células madre de cáncer se evaluó mediante citometría de flujo utilizando el anticuerpo 17c10 frente a ASCT2 conjugado con el fluoróforo Alexa 647. La expresión de ASCT2 en pacientes con LMA y MM fue sustancialmente mayor que en la médula ósea normal, como se describe en la **Fig. 1A**. Mediante el uso de separación por citometría de flujo se aislaron distintas subpoblaciones celulares, como CD38<sup>+</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>; CD38<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>; y CD38<sup>-</sup> y CD34<sup>-</sup>, y sus propiedades de células madre se caracterizaron adicionalmente realizando un ensayo clonogénico sobre cada subpoblación. Los inventores encontraron que solamente las células CD38<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> formaron colonias, lo que corrobora aún más el hallazgo descrito en la bibliografía (Lapidot T *et al.*, Nature 1994; 367(6464):645–8; Bonnet D *et al.* Nat Med 1997; 3(7):730–7.). La expresión de ASCT2 se evaluó en todas las subpoblaciones descritas anteriormente. La **Fig. 1B** describe la alta expresión de ASCT2 en la población de células madre leucémicas, concretamente la población CD38<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> de muestras de pacientes con LMA. Asimismo, la expresión de ASCT2 también es alta en el grueso de la población celular o en la población de células madre no leucémicas en LMA, como se describe en la **Fig. 1C**.

Además, la expresión de ASCT2 también se evaluó en células CD138+, CD19- (células plasmáticas) y CD138-, CD19+ (células madre) de tumores de MM. Los histogramas en la **Fig. 1C** sugieren una expresión alta de ASCT2 en células plasmáticas, en comparación con las células madre de MM. Los datos sustentan que se observó expresión de ASCT2 en médula ósea de muestras de pacientes con LMA y MM, en comparación con la médula ósea de donante normal. Además, ASCT2 está muy sobreexpresada en células madre leucémicas (CML) (CD34+/CD38+) de muestras de pacientes con LMA. Además, las células CD138+, CD19-, también definidas como células plasmáticas de MM, muestran expresión más alta de ASCT2 en comparación con la población de células madre (CD138-, CD19+).

La expresión de ASCT2 también se observó en células madre cancerosas de tumores de páncreas. Se digirieron fragmentos de tumor sólido de páncreas con colágeno III y se preparó una suspensión de células individuales. Las células disociadas se tiñeron con el anticuerpo contra las proteínas de superficie celular EpCAM, CD44, CD24 y con el anticuerpo frente a ASCT2 descrito anteriormente. Las proteínas de superficie celular distintivas para las células madre de cáncer de páncreas se han caracterizado bien. Las células EpCAM+ CD44+ CD24+ se definen como células madre de cáncer en tumores de páncreas (Li, C *et al.* Cancer Res. 2007;67:1030–1037). En la **Fig. 1D** se describe un ejemplo de expresión de ASCT2 en la población de CMC (EpCAM+, CD44+, CD24+). Utilizando esta misma estrategia, se evaluó la expresión de ASCT2 en las poblaciones de células madre de cáncer de tumores de páncreas después de un tratamiento de dosis única con ADC ASCT2-PBD o ADC de control de isotipo. La **Fig. 1E** demuestra que el ADC ASCT2-PBD elimina las poblaciones de células madre de cáncer. Los datos en el presente documento demuestran que el direccionamiento a ASCT2 sería eficaz, no solo en tumores sólidos sino también en cánceres hemáticos y células madre de cáncer.

## Ejemplo 2. Generación de anticuerpos anti-ASCT2

### *Inmunización y generación de hibridomas*

Los anticuerpos frente a ASCT2 se generaron por inmunización con ADN (Chowdhury *et al.*, J. Immunol. Methods 249:147, 2001) con un plásmido que porta el gen de ASCT2 humano. El gen de ASCT2 humano se clonó en el plásmido de expresión pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se inyectaron ratones VelocImmune II (Regeneron, Tarrytown, NY) de ocho semanas por vía intradérmica en la base de la cola cada dos semanas, con 100 µg del plásmido de expresión de ASCT2 a 1 mg/ml en PBS. Se recogieron muestras de sangre a intervalos de 2 semanas, comenzando el día 28 después de la primera inyección, y se ensayaron para anticuerpos específicos frente a ASCT2 mediante citometría de flujo. Se incubaron diluciones en serie de las muestras de sangre con células 293F que expresaban ASCT2 o una proteína de superficie celular irrelevante. Los días 56 y 70 se sacrificaron los ratones con los títulos específicos más altos. Se aislaron linfocitos de ganglios linfáticos y bazo, y se fusionaron con la línea celular de mieloma P3x/63Ag8.653 en una proporción 1:1, siguiendo el método de fusión con polietilenglicol (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN). Las células fusionadas se seleccionaron en medio de crecimiento de hibridoma que contenía hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT).

### *Ensayo de exploración por citometría de flujo*

Se evaluaron la unión a células HEK 293F que expresan ASCT2 en los sobrenadantes de los hibridoma. Mediante tinción por citometría de flujo con un panel de líneas celulares de cáncer que expresan ASCT2, se confirmó adicionalmente la unión específica a ASCT2 de los sobrenadantes para los que se encontró través de citometría de flujo que se unían de forma específica a células HEK 293F que expresan ASCT2. Para finalizar, los sobrenadantes confirmados se convirtieron en IgG1 humanas para una evaluación adicional de la unión.

### *Clonación y expresión de los mAb y los Fab anti-ASCT2 humanos*

Los hibridomas se subclonaron por dilución limitante. Los sobrenadantes de los subclones de IgG purificados por afinidad con Proteína A se exploraron para anticuerpos específicos frente a ASCT2 mediante citometría de flujo, como se describe anteriormente para los hibridomas parentales. El ARNm de hibridomas subclonados se aisló usando Dynabeads mRNA Direct Kit (Invitrogen). La primera cadena del ADNc se sintetizó utilizando la transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen) y cebadores de hexámeros aleatorios. Los genes de VL y VH de Ig humana se amplificaron mediante PCR con un conjunto de cebadores de Ig generados Novagen® (EMD Millipore, N.º de Catálogo 69830). Los productos de VL y VH amplificados por PCR se clonaron en el plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se secuenciaron. Los genes de VH y VL de cada hibridoma se volvieron a amplificar por PCR, añadiendo sitios de enzimas de restricción para la clonación en el vector pOE de IgKappa humana, en donde se clonó el VL en el sitio BssHII/BsiWI fusionado con c-kappa humana, y el VH se clonó en el sitio BsrGI/Sall fusionado con la región constante de la cadena pesada de IgG-1 humana (o región CH1 para la generación del Fab). Los plásmidos pOE resultantes se verificaron mediante secuenciación de ADN.

Los anticuerpos anti-ASCT2 se expresaron de forma transitoria en células Hek293F (Invitrogen) o CHO-G22. Para la expresión en células Hek293F, la transfección se realizó utilizando 293fectin™ (Invitrogen; Cat. n.º 12347-019), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se cultivaron en FreeStyle™ 293 Expression Medium (Invitrogen, Cat. N.º 12338-018), y el volumen de cultivo se duplicó en los días tres y seis postransfección. Las células Hek293F transfectadas se cultivaron durante un total de once días. Para la expresión en células CHO-G22, las células se

transfectaron utilizando Polietilenimina lineal de 25 kDa (Polysciences, Warrington, PA), utilizando el protocolo del fabricante. Las células se cultivaron en medio CD CHO (Invitrogen) y se alimentaron cada dos días con un alimento preparado en el laboratorio. Las células CHO-G22 transfectadas se cultivaron durante un total de doce días.

Después de aislar las IgG de humanas de longitud completa mediante cromatografía de proteína A, se volvió a evaluar la unión a través de citometría de flujo. La **Fig. 2** representa un gráfico de barras que muestra el cambio en veces de la unión de las IgG humanas aisladas 1e8, 3f7, 5a2, 9b3, 10c3, 16b8, 17c10, y 17a10 a células que expresan ASCT2 humana, en comparación con las células transfectadas de forma simulada. Como se observa en la figura, se encontró que varias de las IgG humanas de longitud completa conservaban la actividad de unión a ASCT2.

**Ejemplo 3. Anticuerpos que se unen a ASCT2 como conjugados de anticuerpo-fármaco (los ADC)**

**10 Evaluación de la citotoxicidad mediada por ADC de los anticuerpos que se unen a ASCT2**

Para confirmar la internalización de los anticuerpos parentales y para predecir si pueden suministrar una carga útil citotóxica, los anticuerpos parentales se analizaron en el ensayo de internalización de anticuerpos Hum-ZAP (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sembraron en placa células WiDr positivas para ASCT2, en medio de cultivo, a una densidad de 1,000 células por pocillo de placas de 96 pocillos tratadas para cultivo de tejido y se dejaron adherir durante una noche a 37 °C / CO<sub>2</sub> al 5 %. Para preparar los artículos de ensayo, cada anticuerpo parental se incubó con un anticuerpo secundario (anti-IgG humana de cabra) conjugado con la proteína inactivante de ribosoma, la saporina, durante 30 minutos a temperatura ambiente, para formar un conjugado secundario. Después, se prepararon diluciones seriadas de este conjugado secundario y se añadieron a los pocillos que contenían células.

Después de la incubación a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 % durante 72 horas, se utilizó el ensayo de viabilidad luminiscente CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI) para determinar la citotoxicidad relativa. Brevemente, se añadió reactivo CellTiter-Glo® a cada pocillo y se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. La absorbancia de cada muestra se leyó a 560 nM utilizando un luminómetro Perkin Elmer EnVision®. La tasa de proliferación relativa (%) de las células tratadas con los anticuerpos parentales 1E8 o 17C10, un anticuerpo anti-ASCT2 unido químicamente a saporina (IgGh-saporina) o un control de isotipo unido químicamente a saporina, se comparó con la viabilidad relativa de las células no tratadas de control. Como se muestra en la **Fig. 3A**, la tasa de proliferación celular relativa fue más baja en las células tratadas con los anticuerpos anti-ASCT2 no unidos químicamente a saporina que en las células tratadas con anticuerpos conjugados con saporina.

**30 Evaluación de la citotoxicidad mediada por ADC de los anticuerpos anti-ASCT2 conjugados de forma clásica con la carga útil de tubulisina**

Para confirmar la destrucción mediada por ADC mediante anticuerpos anti-ASCT2 conjugados con una carga útil de tubulisina, los anticuerpos principales, 1E8 y 17C10, se conjugaron directamente con una toxina de clase tubulisina, y se analizó la destrucción citotóxica con los anticuerpos conjugados sobre células de cáncer de colon positivas para ASCT2. Brevemente, se sembraron en placa células SW48, en medio de cultivo, a una densidad de 1,000 células por pocillo de placas de 96 pocillos tratadas para cultivo de tejido y se dejaron adherir durante una noche a 37 °C / CO<sub>2</sub> al 5 %. Para preparar los artículos de ensayo, se diluyó en serie cada anticuerpo (los principales para ASCT2, 1E8 y 17C10, y el control de isotipo) conjugado con la carga útil de tubulisina y se añadieron a los respectivos pocillos. Después de la incubación a 37 °C / CO<sub>2</sub> al 5 % durante 72 horas, se utilizó el ensayo de viabilidad luminiscente CellTiter-Glo® para determinar la citotoxicidad relativa, como se describe anteriormente.

El porcentaje de viabilidad celular se calculó mediante la siguiente fórmula: (luminiscencia promedio de las muestras tratadas/luminiscencia promedio de las muestras de control) x100. Los valores de CI<sub>50</sub> se determinaron utilizando un análisis de regresión no lineal logística con el programa informático GraphPad Prism. La **Fig. 3B** muestra un gráfico de la citotoxicidad de 1 E8 anti-ASCT2, 17C10 anti-ASCT2 y R347 de control de isotipo conjugados de forma clásica con tubulisina AZ1508. La figura muestra que ambos anticuerpos anti-ASCT2 tienen una citotoxicidad similar. Los valores calculados de CI<sub>50</sub> se muestran a continuación en la Tabla 3.

**Tabla 3**

**Destrucción citotóxica mediada por ADC mediante los anticuerpos principales frente a ASCT2 conjugados de forma clásica con tubulisina**

Clon de anticuerpo	17c10	1e8	R347
CI <sub>50</sub> (ng/ml)	45.98	34.83	NE

**50 Clonación de mutaciones de cisteína para conjugación específica de sitio**

Para introducir un resto de cisteína entre los aminoácidos S239 y V240 en la región CH2 de los anticuerpos anti-ASCT2 1E8 y 17C10 se utilizaron métodos de PCR solapante convencionales. Esta cisteína, denominada "inserción 239" o "239i", servirá como el sitio de conjugación para fármacos citotóxicos en la preparación de anticuerpos de ADC anti-ASCT2. La secuencia de aminoácidos del esqueleto de la cadena pesada que contiene la inserción de Maia se muestra en la SEQ ID NO: 9. Los anticuerpos que contenían la cisteína introducida se conjugaron con una carga útil de tubulisina (tubulisina AZ1508) o con una carga útil de pirrolbenzodiazepina (PBD) (SG3249 o SG3315), esencialmente como se describe a continuación.

#### *Conjugación de fármacos que contienen maleimida*

Todos los compuestos evaluados para cargas útiles de ADC (AZ1508, SG3249, SG3315) contienen un enlazador y un grupo maleimida que se conjugan fácilmente con un resto tiol de un anticuerpo, formando un enlace tiol-maleimida. Las citotoxinas que comprenden un grupo maleimida (por ejemplo, tubulisina 1508) se pueden conjugan con restos de cisteína específicos técnicamente diseñados en los anticuerpos anti-ASCT2 de la invención (por ejemplo, 17c10, 1e8). Como alternativa, u de forma opcional, se pueden métodos de conjugación clásicos para unir un agente citotóxico a los anticuerpos descritos. Los métodos para la conjugación de citotoxinas a restos de lisina y cisteína nativos en anticuerpos son bien conocidos en la técnica. A continuación se proporcionan métodos representativos para la conjugación específica de sitio (en restos de cisteína técnicamente diseñados) y clásica (en restos de cisteína nativos).

Un procedimiento representativo de conjugación de anticuerpo-fármaco específica del sitio incluye las etapas de (a) desocupar las cadenas de tamaño de los aminoácidos derivatizables (por ejemplo, cisteínas), (b) oxidar, (c) conjugan una carga útil (por ejemplo, un agente citotóxico tal como tubulisina 1508), y (d) depuración mediante la eliminación de los reactivos de conjugación y de la carga útil que no ha reaccionado. Por ejemplo, puede llevarse a cabo la conjugación con una cisteína técnicamente diseñada formulando el anticuerpo en PBS 1X con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM. Se utiliza reducción suave para generar tioles libres añadiendo cuarenta equivalencias de clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina por anticuerpo e incubando a 37 °C durante tres horas. Se utilizaron tres diálisis sucesivas en PBS 1X con ácido EDTA 1 mM para eliminar el clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina. Como alternativa, para eliminar el clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina se pueden utilizar columnas de desalado. Se permite que vuelvan a formarse los enlaces disulfuro intercatenarios del anticuerpo mediante la adición de aproximadamente 20 equivalencias de ácido deshidroabiético (dhAA) e incubación durante aproximadamente cuatro horas a temperatura ambiente.

En la preparación para la conjugación, se añadió dimetilsulfóxido al diez por ciento v/v al anticuerpo anti-ASCT2. Se añadieron ocho o doce equivalencias de carga útil de tubulisina 1508 (para carga de fármaco de 2V y 4V, respectivamente) en dimetilsulfóxido y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Como alternativa, la incubación se puede realizar a 4 °C durante aproximadamente 16 horas. La reacción se interrumpió añadiendo aproximadamente 4 equivalentes molares de N-acetil cisteína (NAC) por carga útil (es decir, 32 o 48). La carga útil libre se eliminó del anticuerpo conjugado utilizando hidroxipatita cerámica, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Si se desea, puede someterse el producto final a intercambio de tampón. Para confirmar la pureza y la conjugación a la cadena pesada, los anticuerpos conjugados se pueden analizar mediante cualquier método conocido en la técnica. En algunos casos, se puede utilizar SDS-PAGE no reductora y reductora para confirmar la pureza y la conjugación a la cadena pesada.

Se preparan los ADC con fármacos conjugados aleatoriamente con restos de cisteína nativos mediante reducción parcial del anticuerpo, seguido de la reacción con el enlazador-fármaco deseado. El anticuerpo a una concentración de 5 mg/ml se reduce parcialmente mediante la adición de aproximadamente 3 equivalentes molares de DTT a pH 8.0, seguido de incubación a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 2 horas. Después, la reacción de reducción se enfría en hielo y el exceso de DTT se elimina, por ejemplo, mediante diafiltración. Después, se añade el enlazador-fármaco a una proporción molar de enlazador-fármaco/tiol de aproximadamente 1:10. Se lleva a cabo la reacción de conjugación en presencia de ~10 % v/v de DMSO. Después de la conjugación, se añade cisteína libre en exceso (una proporción de aproximadamente 2 veces molar con respecto al enlazador-fármaco) para inactivar el enlazador-fármaco que no ha reaccionado, para producir el aducto de cisteína-enlazador-fármaco. Se purificó la mezcla de reacción (por ejemplo, mediante cromatografía de interacción hidrófoba) y se sometió a intercambio de tampón en PBS. Se determinó la distribución de carga del fármaco utilizando métodos convencionales, tales como cromatografía de interacción hidrófoba y cromatografía de fase inversa reducida.

#### **Ejemplo 4. Caracterización de los mAb y los ADC que se unen a ASCT2**

##### *Unión específica a ASCT2 de los anticuerpos frente a ASCT2 en células de cáncer colorrectal*

Para determinar si la unión de determinados clones de hibridoma era específica para el antígeno ASCT2, se evaluó la unión después de la atenuación de la expresión de ASCT2 por ARNhc. Brevemente, se transdujeron células WiDr con lentivirus que expresan ARNhc para ASCT2 o ARNhc sin diana (ARNhcSD). La unión de los dos clones de hibridoma anti-ASCT2, 17c10 y 1e8, se evaluó a las 72 horas posinfección. Como se observa en la **Fig. 4**, la atenuación de la expresión de ASCT2 anuló significativamente la unión de los clones respectivos y confirmó adicionalmente la unión específica de antígeno de los mAb 17c10 y 1e8 frente a ASCT2.

*Cinética de internalización del anticuerpo anti-ASCT2 no conjugado*

La internalización del anticuerpo tras la unión al antígeno diana es un requisito previo para conseguir el efecto del ADC deseado. Por lo tanto, se examinaron las características de internalización de los anticuerpos frente a ASCT2. Las células WiDr se incubaron con el anticuerpo anti-ASCT2 17c10 conjugado con Alexa 488 (17c10-Alexa 488) durante diversos períodos de tiempo. Después, las células se lavaron e incubaron con o sin anticuerpo anti-Alexa 488 durante 45 minutos en hielo, para desactivar las señales de la superficie celular. Las intensidades de fluorescencia de la señal total y la señal desactivada (que representa el anticuerpo internalizado) se midieron mediante análisis por citometría de flujo. Como se observa en la **Fig. 5A**, el anticuerpo anti-ASCT2 17c10 mostró una internalización aumentada a lo largo del tiempo, en comparación con el anticuerpo de control de isotipo, el cual no mostró internalización.

*Cinética de internalización del ADC de ASCT2 (17c10AZ1508) medida por destrucción citotóxica*

Las células se pulsaron con anticuerpo anti-ASCT2 conjugado con tubulisina AZ1508 (17c10-AZ1508) durante diversos periodos de tiempo. Después de eso, el medio que contenía ADC se reemplazó con medio recién preparado y las células se incubaron adicionalmente durante 4 días. La viabilidad celular se midió utilizando el kit CTG. Las curvas de respuesta a la dosis se representaron como un porcentaje de las células de control no tratadas y se muestra un gráfico representativo en la **Fig. 5B**. Los valores de  $CI_{50}$  se calcularon como se describe anteriormente y los resultados se resumen a continuación en la Tabla 4.

**Tabla 4****Cinética de internalización del ADC de ASCT2 (17c10AZ1508)**

Tiempo	$CI_{50}$ (ng/ml)	
	17c10	1e8
10 minutos	410.9	963.6
30 minutos	295.5	819.6
120 minutos	100	317
8 horas	29.04	110.9

*Determinación de la afinidad (unión de 17c10 y 1e8 a líneas celulares que expresan ASCT2)*

Para evaluar la afinidad de unión y la reactividad cruzada de los anticuerpos específicos para ASCT2, se utilizaron líneas celulares humanas, de mono cinomolgo y procedentes de CHO que expresan ASCT2. Las afinidades aparentes se midieron titulando los anticuerpos marcados con fluoróforo. Los resultados representativos se resumen a continuación en la Tabla 6 y se muestran en la **Fig. 6**.

La Fig. 6 muestra gráficos de citometría de flujo resultantes de la unión de los anticuerpos anti-ASCT2 17c10 y 1e8, y R347 de control de isotipo, a las líneas celulares que expresan ASCT2. Los resultados para la línea celular de cáncer humano Cal27 se muestran en la **Fig. 6A**; los resultados para la línea celular de cáncer humano FaDu se muestran en la **Fig. 6B**; los resultados para la línea celular de cáncer humano SSC15 se muestran en la **Fig. 6C**; los resultados para la línea celular de cáncer humano WiDr se muestran en la **Fig. 6D**; los resultados para las células CHOK1, que expresan de forma estable ASCT2 humana, se muestran en la **Fig. 6E**; los resultados para las células CHOK1, que expresan de forma estable ASCT2 de cyno, se muestran en la **Fig. 6F**; los resultados para la línea celular de cáncer de cyno CynoMK1 se muestran en la **Fig. 6G** y los resultados para las células CHOK1 transfectadas de forma simulada se muestran en la **Fig. 6H**. Los valores de  $CE_{50}$  para 17c10 y 1e8 que se unen a las líneas celulares que expresan ASCT2 se indican a continuación en la Tabla 5.

**Tabla 5****Valores de  $CE_{50}$  para 17c10 y 1e8 que se unen a las líneas celulares que expresan ASCT2**

Línea celular	$CE_{50}$ para 17c10 (nM)	$CE_{50}$ para 1E8 (nM)
Fadu	3.8	6.8
SSC15	3.6	8.8
WiDr	7.0	5.8



Línea celular	CE <sub>50</sub> para 17c10 (nM)	CE <sub>50</sub> para 1E8 (nM)
Cal27	2.8	13
Cyno MK1	6.7	14.8
ASCT2Hu-CHOK1	8.6	8.1
ASCT2Cyno-CHOK1	9.6	28.4

*Especificidad del anticuerpo 17c10 por al antígeno ASCT2*

5 El anticuerpo anti-ASCT2 17c10 no tiene afinidad por ASCT1 (SLC1A4), el otro miembro de la familia SLC1A. El silenciamiento de la expresión de ASCT1 mediante los ARNhc no elimina la unión específica a ASCT2 de 17c10 en células SKMEL-2, como se observa en el gráfico mostrado en la **Fig. 7A**. La eficacia de atenuación del ARNhc se confirmó adicionalmente mediante análisis por transferencia de Western. Además, no se observó cambio en el perfil de citotoxicidad de las células en las que la expresión de ASCT1 fue silenciada mediante los ARNhc respectivos, como se observa en el gráfico mostrado en la **Fig. 7B**. Los resultados se resumen en la tabla 6.

**Tabla 6**

**Unión específica a ASCT2 y destrucción citotóxica del ADC de 17c10**

10

	ARNhcSD	ARNhc1 de ASCT1	ARNhc2 de ASCT1	ARNhc de ASCT2
CI <sub>50</sub> (ng/ml)	14.34	7.59	4.96	205.4

*Reactividad cruzada y citotoxicidad de los anticuerpos del ADC frente ASCT2 con ASCT2 de cyno*

15 Se evaluaron los clones 17c10 y 1e8 de unión anti-ASCT2 conjugados con tubulicina AZ1508 para la unión a ASCT2 de cyno expresados de forma estable en células CHOK1, ASCT2 humana expresada de forma estable en células CHOK1 y moléculas de control expresadas en células CHOK1. Cuando el anticuerpo 17c10 frente a ASCT2 (**Fig. 8A**) y el anticuerpo 1e8 frente a ASCT2 (**Fig. 8B**) están conjugados con la carga útil de tubulicina 1508, muestran una potente actividad citotóxica en células CHOK1 que expresan ASCT2 humana y de cyno, pero no en CHOK1 no transfectadas o CHOK1-ABCB5. Estos resultados se resumen a continuación en la Tabla 7.

**Tabla 7**

**Unión específica a ASCT2 y destrucción citotóxica del ADC de 17c10**

20

	Unión		Citotoxicidad	
	CE <sub>50</sub> (nM)		CI <sub>50</sub> (ng/ml)	
	<b>17C10</b>	<b>1e8</b>	<b>17C10</b>	<b>1e8</b>
ASCT2Hu	8.6	8.1	5.531	20.69
ASCT2 de cyno	9.6	28.4	8.59	140.3

*Conversión a estirpe germinal de 17c10*

25 Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL para 17c10 se alinearon con las secuencias convertidas a estirpe germinal humanas conocidas en la base de datos VBASE y la estirpe germinal más próxima se identificó por similitud de secuencia. Para el dominio VH, esta fue IgVh4-34\*01; para el dominio VL, fue IgKv1-5\*03. Para 17c10, el procedimiento de conversión a estirpe germinal implicó invertir 1 resto del armazón en el dominio VH y 5 restos en el dominio VL. En el dominio VH, la mutación de inversión fue en la posición 82a de Kabat, donde la treonina (T) se invirtió a serina (S). En el dominio VL, las mutaciones estaban en las posiciones de Kabat 13, 21, 39, 70 y 76, donde en la posición 13 de Kabat la treonina (T) se invirtió a alanina (A); en la posición 21 de Kabat la leucina (L) se invirtió a isoleucina (I); en la posición 39 de Kabat la asparragina (N) se invirtió a lisina (K); en la posición 70 de Kabat el aspartato (D) se invirtió a glutamato (E) y en la posición 76 de Kabat, la treonina (T) se invirtió a serina (S). Estos cambios se realizaron sintetizando los dominios VH y VL con estas mutaciones y reemplazando los VH y VL existentes utilizando digestión de restricción y ligamiento. Tanto 17c10 convertido a estirpe germinal como el original

30

(no convertido a estirpe germinal) se expresaron como IgG, y su afinidad por múltiples líneas celulares que expresan ASCT2 se evaluó mediante citometría de flujo. Como se observa en la **Fig. 9A a Fig. 9D**, no hubo diferencia en la unión de 17c10 convertido a estirpe germinal o el 17c10 parental, a las células WiDr, o a células CHO que expresan SCT2Hu o ASCT2Cy.

#### 5 **Ejemplo 5. Destrucción citotóxica por los ADC de ASCT2 en diversos cánceres**

El anticuerpo 17c10 se conjugó con una carga útil de PBD (SG3315) o de tubulisina (AZ1508) a través de un sitio de conjugación específica del sitio, como se describe anteriormente. La proporción fármaco-anticuerpo (PFA) se estimó como de aproximadamente 2.0 para cada activo. Los ensayos citotóxicos se realizaron utilizando células cancerosas de diversas indicaciones, tal como cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de pulmón, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (CCECC), cáncer de próstata y cáncer de pulmón negativo para ASCT2. Como se muestra en la **Fig. 10A a la Fig. 10 F**, el anticuerpo de ADC 17c10 conjugado con AZ1508 tenía una actividad citotóxica mayor que el anticuerpo de control unido a tubulisina. El anticuerpo anti-ASCT2 17c10 conjugado con SG3249 o SG3315 también tenía una actividad citotóxica mayor que los anticuerpos de control unidos a tubulisina AZ1508, o unidos a PBD SG3249, o unidos a SG3315. En la **Fig. 11A** se muestra un gráfico que muestra los resultados de los ensayos citotóxicos utilizando 17c10 conjugado con SG3249, y en la **Fig. 11B** se muestra un gráfico que muestra los resultados de los ensayos citotóxicos utilizando 17c10 conjugado con SG3315. Los valores de  $CI_{50}$  se resumen a continuación en la Tabla 8.

**Tabla 8:**

#### **Inhibición de la proliferación de células cancerosas por los ADC de ASCT2**

Indicación	Línea celular	$CI_{50}$ (ng/ml)		
		17c10-239i-AZ1508	17c10-239i-SG3315	17c10-239i-SG3249
Colon	SW48	3.5	0.2	0.1
Colon	HT29	2.5	2	1.8
Colon	WiDr	1.9	0.25	0.4
Colon	DLD1	17.1	11.5	10.3
Colon	HCT116	25.42	6.54	5.625
CCECC	OE21	4.94	11.26	-
CCECC	FADU	82.7	17.5	15.88
CM de pulmón	H2170	4.1	3.7	3.5
CMP de pulmón	H69		200	189.4
CCE de pulmón	H2081	-	-	-
Próstata	22RV1	34.44	4.299	—
Próstata	DU145	408.4	568.7	—
Próstata	PC-3	13.43	21.94	—
Cáncer de páncreas	BXPC3	7.85	3.28	2.98
LMA	HL60	47.41	—	9.796
LMA	KG1	37.72	—	64.25
LMA	MOLM-13	69.21	—	0.1001
LMA	Mv4-11	75	—	0.0515
LMA	Nomo-1	45	—	9.9

Indicación	Línea celular	CI <sub>50</sub> (ng/ml)		
		17c10-239i-AZ1508	17c10-239i-SG3315	17c10-239i-SG3249
LMA	TF-1A	5.57	—	0.17
de Burkitt	Raji	76.66	—	7.89
MM	H929	14.9	—	0.6966
MM	OPM-2	0.8	—	1.503

### Ejemplo 6. Los ADC de ASCT2 inhiben el crecimiento tumoral *in vivo*

5 Todos los procedimientos *in vivo* se realizaron en conformidad con las directrices institucionales en una instalación acreditada por la AAALAC y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de MedImmune, LLC. Para probar la capacidad del anticuerpo del ADC de ASCT2 de destruir células tumorales, se inocularon WiDr (100  $\mu$ l/10<sup>6</sup> células/ratón) o tumores de páncreas primarios (PDX) por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones desnudos hembra de 3-5 semanas (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Los ratones se mantuvieron varias semanas hasta desarrollar tumores; una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente los 150-200 mm<sup>3</sup>, los ratones se distribuyeron aleatoriamente y se asignaron a un grupo de tratamiento (10 ratones/grupo). Posteriormente, se les inyectó a los ratones distintas dosis por vía intravenosa de los ADC anti-ASCT2 (17c10-Az1508 o 17c10-SG3315, o 17c10-SG3249) o un anticuerpo conjugado a un fármaco de control de isotipo. El peso corporal y el volumen tumoral de los ratones tratados con xenoinjerto se controlaron durante los períodos de tiempo respectivos. El volumen tumoral se calculó utilizando la siguiente fórmula: (diámetro más corto)<sup>2</sup> x (diámetro más largo) x 0.5, y los resultados se muestran en las Fig. 12A, Fig. 12B y Fig. 12C.

15 De forma adicional, se evaluó la eficacia *in vivo* de 17c10-SG3249 en un panel de modelos de neoplasias hemáticas que representa distintas subpoblaciones que expresan niveles variables de ASCT2. Los ADC se administraron de forma semanal a una dosis de 0.4 mg/kg (o 0.5 mg/kg) y 0.1 mg/kg, para un total de cuatro dosis en modelos de xenoinjerto de tumor diseminado. Las curvas de Kaplan-Meier demuestran un aumento significativo en la prolongación de la vida para las cohortes 17c10-SG3249, en comparación con los controles de ADC de isotipo o no tratados, como se muestra en la FIG. 13A y FIG. 13B. La administración de 17c10-SG3249 en varios modelos de tumor de xenoinjerto de LMA mostró un aumento sustancial en la prolongación de la vida, en comparación con las otras cohortes, tales como SOC, no tratados y ADC de control de isotipo. En los modelos de LMA TF1a, 17c10-SG3249 demostró una actividad superior (mediana de supervivencia >205 días), en comparación con el ADC de control de isotipo (66 días). De forma similar, 17c10-SG3249 demostró una fuerte inhibición del crecimiento tumoral y prolongación de la vida en varios modelos de mieloma múltiple (MM) MM1.S (mediana de supervivencia de 123.5 días frente a 55.5 días para el control no tratado). Los resultados para 17c10-SG3249 en varias neoplasias hemáticas se resumen a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9: Supervivencia media hemática

Modelo	Tiempo medio de supervivencia (días)						
	No tratado	ADC isotipo de	ASCT2-17C10-239i-SG3249				
			0.5 mg/kg	0.4 mg/kg	0.25 mg/kg	0.1 mg/kg	0.05 mg/kg
TF1a	66	83	>205**		>205*	>205**	>205**
MM.1S	55.5	63		123.5***		117***	
RAJI	16	17*	49.5***			22***	19**
697	20.5	22	68***			46***	36***

Significación estadística de los no tratados (prueba del orden logarítmico (mantel-Cox)) - \*\*\* = P<0.0001, \*\* = P<0.001, \* = P<0.01

**Ejemplo 7. Conjugación de fracciones químicas a anticuerpos anti-ASCT2 para formar los ADC**

Se desarrolló un método de purificación para los mAb anti-ASCT2. Brevemente, el líquido de cultivo celular recogido se sometió a una etapa de captura por proteína A realizada utilizando la resina MAbSelect Sure (GE Healthcare), para capturar la proteína del sobrenadante del cultivo celular y para eliminar las impurezas relacionadas con el procedimiento y el producto. Todos los pasos del procedimiento se realizaron a un caudal lineal de 300 cm/h. La resina se equilibró con Tris 50 mM, pH 7.4, y el medio condicionado se cargó en la columna hasta un máximo de carga de 30 g/l de resina. La columna se volvió a equilibrar con Tris 50 mM, pH 7.4, y después se expuso a dos etapas de lavado optimizadas para reducir las impurezas y disminuir el exceso de cadena ligera presente en el medio condicionado. La primera etapa de lavado consistió en Tris 50 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 7, y el segundo lavado contenía acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 5.0. Después, la columna se volvió a equilibrar con Tris 50 mM, pH 7.4, y el producto se eluyó con acetato de sodio 25 mM, pH 3.6. El producto se recogió a partir de una DO 0.5 en el lado ascendente del pico de elución hasta una DO 0.5 en el sitio descendente. Después de cada ciclo de purificación, la columna se extrajo con ácido acético 100 mM, después se volvió a equilibrar con Tris 50 mM, pH 7.4, se desinfectó con hidróxido de sodio 0.1 N y se conservó en alcohol bencílico al 2 % (v/v), acetato de sodio 100 mM, pH 5.0. El rendimiento típico de esta etapa es del 70-75 %.

Se realizó un tratamiento a pH bajo para la inactivación viral. Brevemente, el producto MAbSelect Sure se ajustó hasta un pH de 3.5 mediante la adición de ácido acético 1 M. Después de un tiempo de espera de 60 minutos, la solución se neutralizó mediante la adición de Tris 1 M hasta un pH de 7.4. Posteriormente se filtró el producto.

Como etapa de purificación intermedia, se realizó una cromatografía de modo mixto utilizando resina Capto Adhere (GE Healthcare). Esta columna se hizo funcionar en un modo de flujo continuo: La columna se equilibró con Tris 50 mM, pH 7.4, y la solución de proteína neutralizada se cargó en la columna. Las impurezas se unen a la resina mientras que el producto se recupera en la acumulación del flujo continuo. El rendimiento típico de la etapa fue del 80-84 %.

La etapa de depuración se realizó utilizando la resina de intercambio catiónico HS 50 (POROS). Esta etapa se realiza en modo unión-elución y sirve para reducir aún más las impurezas relacionadas con el procedimiento. La columna se equilibró con Tris 50 mM, pH 7.4, y se cargó en la columna el producto de la etapa de cromatografía de modo mixto. La columna se lavó posteriormente con Tris 50 mM, pH 7.4, después con Tris 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7.4 y después se eluyó con Tris 50 mM, cloruro de sodio 400 mM, pH 7.4. El producto se recogió a partir de una DO 0.5 en el lado ascendente del pico de elución hasta una DO 0.5 en el lado descendente. Después de cada ciclo de purificación, la columna se extrajo utilizando Tris 50 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 7.4, se desinfectó con hidróxido de sodio 1 N y se conservó en NaOH 0.1 N. El rendimiento típico de esta etapa es del 95-98 %.

El intermediario de mAb purificado se concentró utilizando una membrana Pellicon 3 Ultracel con límite de peso molecular de 30 kDa (MWCO) y se transfirió a tampón de formulación (histidina 20 mM, sacarosa 240 mM, pH 6.0) por diafiltración. La concentración de proteína final fue de aproximadamente 20 mg/ml. Si era necesario, la proteína se conservó congelada a -80 °C hasta la conjugación. La Tabla 10 resume a continuación la calidad del producto durante el procedimiento de purificación de anticuerpos monoclonales.

**Tabla 10****Pureza del procedimiento del anticuerpo anti-ASCT2 en el procedimiento aguas abajo**

Etapa del procedimiento	Pureza de monómero mediante HP SEC	PCH (ng/mg)	ADN (ng/mg)
MAb Select Sure	98.0 %	2698	0.14
Capto Adhere	99.0%	45	0.0004
HS50	99.2 %	27	0.002

**Conjugación del anticuerpo anti-ASCT2 con tubulisina AZ1508**

El conjugado anticuerpo-fármaco se preparó por conjugación específica de sitio de la tubulisina (AZ1508) con los dos restos de cisteína técnicamente diseñados libres, a través de química de maleimida.

El intermediario de mAb purificado se descongeló y se ajustó el pH a pH 7.0 mediante adición de Tris base 1 M. La solución de proteína se diluyó hasta una concentración final de 7.5 mg/ml con tampón de histidina 20 mM, pH 7.0, y se añadió EDTA hasta una concentración final de 1 mM. La proteína se transfirió a un recipiente de reacción adecuado y la temperatura se ajustó a 37 °C. Se añadió el agente reductor tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) a partir

de una solución madre 50 mM recién preparada en una proporción molar de TCEP:mAb = 30:1. La solución se incubó con agitación suave a 37 °C durante 3 horas. Después de este tiempo de incubación, el agente reductor se eliminó mediante diálisis o diafiltración frente a tampón de histidina 20 mM/EDTA 1 mM, pH 7.0. El producto recuperado se filtró a través de un filtro de 0.22 µm. Para la oxidación, la solución de proteína se incubó con ácido deshidroascórbico (DHA) a una proporción molar de 10:1 (DHA:mAb). La incubación se realizó a 22-25 °C durante 4 horas con agitación suave (a una velocidad de mezcla de 50 rpm). Después de este tiempo, se añadió la carga útil de tubulisina (AZ1508) a partir de una solución madre 10 mM en DMSO a una proporción molar de 8:1 de carga útil:mAb. Se añadió gota a gota DMSO adicional hasta alcanzar una concentración final del 10 % (v/v). La mezcla se incubó durante 1 hora a 22-25 °C con agitación suave para permitir la formación del conjugado anticuerpo-fármaco. Después, la reacción se interrumpió por la adición de N-acetilcisteína (NAC) a partir de una solución madre 100 mM en una proporción molar de NAC:tubulisina de 5:1.

Para eliminar fragmentos de proteína, agregados y el exceso de carga útil de tubulisina libre, se realizó una purificación posconjugación utilizando hidroxapatita cerámica (CHT) tipo I (Biorad). La columna se hizo funcionar en modo de unión-elución a un caudal lineal de 180 cm/h. A la mezcla de anticuerpo-fármaco-conjugado inactivada, se añadió fosfato de sodio hasta una concentración final de 10 mM a partir de una solución madre de 300 mM. La columna de CHT se preequilibró con fosfato de sodio 300 mM, pH 6.5, y se equilibró con fosfato de sodio 10 mM, pH 6.5. La mezcla de conjugado anticuerpo-fármaco se cargó hasta un máximo de carga de 20 g/l y la columna se reequilibró con fosfato de sodio 10 mM, pH 6.5. La elución se realizó con un gradiente lineal hasta cloruro de sodio 1 M en fosfato de sodio 10 mM, pH 6.5, con 10 volúmenes de columna. El pico de elución se fraccionó y las fracciones se analizaron por HP SEC. Se combinaron las fracciones que contenían proteína conjugada con una pureza de monómero >95 %. Después de cada ciclo de purificación, la columna se extrajo fosfato de sodio 300 mM, pH 6.5, se desinfectó con hidróxido de sodio 1 N y se conservó en hidróxido de sodio 0.1 N.

El conjugado de fármaco anticuerpo (ADC) combinado se concentró y se cambió al tampón de formulación final por filtración de flujo tangencial utilizando celulosa regenerada o membranas de PES con un MWCO de 30 kDa. Se adicionó el excipiente PS80 a partir de una solución madre al 10 %. La concentración final de ADC fue de 5 mg/ml en histidina 20 mM, sacarosa 240 mM, PS80 al 0.02 %, pH 6.0. En estas condiciones, el ADC generado mostró <12 % de cadena pesada no conjugada, 75 al 82 % de cadena pesada monoconjugada y una proporción de fármaco con respecto a anticuerpo de 1.8-1.9.

#### **Conjugación del anticuerpo anti-ASCT2 con pirrolbenzodiazepina (PBD) SG3249**

El conjugado anticuerpo-fármaco se preparó por conjugación específica de sitio de PBD (SG3249) con los dos restos de cisteína técnicamente diseñados libres, a través de química de maleimida. La secuencia del procedimiento es la misma que la analizada para la conjugación de tubulisina resumida anteriormente, aunque difieren las condiciones exactas.

El intermediario de mAb purificado se descongeló y se ajustó el pH a pH 7.0 mediante adición de Tris base 1 M. Las etapas de reducción, oxidación y conjugación para el conjugado de PBD se realizaron a una concentración de proteína de 20 mg/ml en histidina 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7.0. La proteína se transfirió a un recipiente de reacción adecuado y la temperatura se ajustó a 37 °C. Se añadió el agente reductor ditioneitol (DTT) a partir de una solución madre 50 mM recién preparada en una proporción molar de DTT:mAb = 30:1. La solución se incubó con agitación suave a 37 °C durante 1 hora. Después de este tiempo de incubación, el agente reductor se eliminó mediante diálisis o diafiltración frente a tampón de histidina 20 mM/EDTA 1 mM, pH 7.0. El producto recuperado se filtró a través de un filtro de 0.22 µm. Para la oxidación, la solución de proteína se incubó con ácido deshidroascórbico (DHA) a una proporción molar de 10:1 (DHA:mAb). La incubación se realizó a 22-25 °C durante 1 hora con agitación suave (a una velocidad de mezcla de 50 rpm). Después de este tiempo, se añadió la carga útil de PBD (SG3249) a partir de una solución madre 10 mM en DMSO a una proporción molar de carga útil:mAb de 8.5:1. No se añadió DMSO adicional a esta reacción, la concentración eficaz de DMSO debida la adición de DHA y de la carga útil fue de aproximadamente el 11.4 %. La mezcla se incubó durante 1 hora a 22-25 °C con agitación suave para permitir la formación del conjugado anticuerpo-fármaco. Después, la reacción se interrumpió por la adición de N-acetilcisteína (NAC) a partir de una solución madre 100 mM en una proporción molar de NAC:PBD de 4:1.

Para eliminar fragmentos de proteína, agregados y el exceso de carga útil de PBD libre, se realizó una purificación posconjugación utilizando hidroxapatita cerámica (CHT) tipo I (Biorad). La columna se hizo funcionar en modo de unión-elución a un caudal lineal de 180 cm/h. El pH de la mezcla de reacción de anticuerpo-fármaco inactivada se ajustó a pH 7.0 mediante la adición de Tris base 1 M. La columna de CHT se preequilibró con fosfato de sodio 300 mM, pH 6.5, y se equilibró con fosfato de sodio 10 mM, pH 6.5. La mezcla de conjugado anticuerpo-fármaco se cargó hasta un máximo de carga de 20 g/l y la columna se reequilibró con fosfato de sodio 10 mM, pH 6.5. Después, la proteína unida se lavó con fosfato de sodio 10 mM, caprilato de sodio 25 mM, pH 6.5, para eliminar el exceso de fármaco libre, seguido de reequilibrado con fosfato de sodio 10 mM, pH 6.5. La elución se realizó con un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0.3 a 1 M en fosfato de sodio 10 mM, pH 6.5, con 10 volúmenes de columna. El pico de elución se fraccionó y todas las fracciones se analizaron por HP SEC. Se combinaron las fracciones que contenían proteína conjugada con una pureza de monómero >95 %. Después de cada ciclo de purificación, la columna se extrajo cloruro de sodio 2 M, se desinfectó con hidróxido de sodio 1 N y se conservó en hidróxido de sodio 0.1 N.

El ADC se concentró y se cambió al tampón de formulación final por filtración de flujo tangencial utilizando celulosa regenerada o membranas de PES con un MWCO de 30 kDa. Se adicionó el excipiente PS80 a partir de una solución madre al 10 %. La concentración final de ADC fue de 5 mg/ml en histidina 20 mM, sacarosa 240 mM, PS80 al 0.02 %, pH 6.0. SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS

5 **VH de 17c10 original; SEQ ID NO: 1**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIHHSGGANYNPSLKSRTISVDTSKN  
QFSLKLTAVTAADTAVYYCARGQGKNWHYDYFDYWGQGLTVTVSSA

**VL de 17c10 original; SEQ ID NO: 2**

10 DIQMTQSPSTLSTSVGDRVTLTCRASQSIRSWLAWYQQNPGKAPKLLIYKASILKIGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQ  
PDDFATYYCQQYYYSRFTFGQGTKVEIK

**VH de 1e8 original; SEQ ID NO: 3**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIPQPPGKGVWIGEINHSGSTNYNPSLKSRTISSDTSKN  
QFSLKLTAVTAADTAVYYCARGQGKNWNYDYFDYWGQGLTVTVSSA

**VL de 1e8 original; SEQ ID NO: 4**

15 DIQMTQSPSTLSASVGDRVTLTCRASQSIRSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLKSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL  
QPDDFATYYCQQYYFSRFTFGQGTKVEIK

**VH de 17c10 convertido a estirpe germinal; SEQ ID NO: 5**

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIHHSGGANYNPSLKSRTISVDTSKN  
QFSLKLTAVTAADTAVYYCARGQGKNWHYDYFDYWGQGLTVTVSSA

20 **VL de 17c10 convertido a estirpe germinal; SEQ ID NO: 6**

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTLTCRASQSIRSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASILKIGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP  
DDFATYYCQQYYYSRFTFGQGTKVEIK

**VH de 1e8 convertido a estirpe germinal; SEQ ID NO: 7**

25 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIHHSGSTNYNPSLKSRTISVDTSKNQ  
FSLKLTAVTAADTAVYYCARGQGKNWNYDYFDYWGQGLTVTVSSA

**VL de 1e8 convertido a estirpe germinal; SEQ ID NO: 8**

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTLTCRASQSIRSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASSLKSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQ  
PDDFATYYCQQYYFSRFTFGQGTKVEIK

**Esqueleto de la cadena pesada de Maia (inserción de la cisteína recuadrada y en negrita); SEQ ID NO: 9**

30 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGT  
QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPS **C**  
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

35 **HCDR1 convertida a estirpe germinal de 17c10 (numeración de Kabat) SEQ ID NO: 10**

GYYSWS

**HCDR2 convertida a estirpe germinal de 17c10 (numeración de Kabat); SEQ ID NO: 11**

EIHHSGGANYNPSLKS

**HCDR3 convertida a estirpe germinal de 17c10 (numeración de Kabat); SEQ ID NO: 12**

40 GQGKNWHYDYFDY

**LCDR1 convertida a estirpe germinal de 17c10 (numeración de Kabat); SEQ ID NO: 13**

RASQSIRSWLA

**LCDR2 convertida a estirpe germinal de 17c10 (numeración de Kabat); SEQ ID NO: 14**

KASILKI

**LCDR3 convertida a estirpe germinal de 17c10 (numeración de Kabat); SEQ ID NO: 15**

QQYYSYSRT

**HCDR1 convertida a estirpe germinal de 1e8 (numeración de Kabat); SEQ ID NO: 16**

5 GYYWS

**HCDR2 convertida a estirpe germinal de 1e8 (numeración de Kabat); SEQ ID NO: 17**

EIHHSNSTNYNPSLKS

**HCDR3 convertida a estirpe germinal de 1e8 (numeración de Kabat); SEQ ID NO: 18**

GQGKNWNYDYFDY

10 **LCDR1 convertida a estirpe germinal de 1e8 (numeración de Kabat); SEQ ID NO: 19**

RASQSIRSWLA

**LCDR2 convertida a estirpe germinal de 1e8 (numeración de Kabat); SEQ ID NO: 20**

KASSLKS

**LCDR3 convertida a estirpe germinal de 1e8 (numeración de Kabat); SEQ ID NO: 21**

15 QQYYSFSRT

**HCDR2 consenso; SEQ ID NO: 22**

EIHHSGX1X2NYNPSLKS; donde X1 es S o G, y X2 es A o T

**HCDR3 consenso; SEQ ID NO: 23**

GQGKNWX1YDYFDY; donde X1 es H o N

20 **LCDR2 consenso; SEQ ID NO: 24**

KASX1LKX2; donde X1 es I o S y X2 es I o S

**LCDR3 consenso; SEQ ID NO: 25**

QQYYSX1SRT; donde X1 es Y o F

**Cadena ligera Kappa humana; SEQ ID NO: 26**

25 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKA  
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**Listado de secuencias**

<110> MEDIMMUNE, LLC

<120> MOLÉCULAS DE UNIÓN ESPECÍFICAS PARA ASCT2 Y USOS DE LAS MISMAS

30 <130> ASCT2-100-WO-PCT

<140> PCT/US2016/061219

<141> 2016-11-10

<150> 62/253,774

<151> 2015-11-11

35 <150> 62/253,371

<151> 2015-11-10

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 1

```

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

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

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

Gly Glu Ile His His Ser Gly Gly Ala Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50          55          60

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

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

Arg Gly Gln Gly Lys Asn Trp His Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
          100          105          110

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

10

<210> 2

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 2



ES 2 796 560 T3

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Ser Arg  
 85 90 95

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

<210> 3

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 3

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

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

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

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

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

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

Arg Gly Gln Gly Lys Asn Trp Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

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

10

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 4

```

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Ser Arg
           85           90           95

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

10 <210> 5

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 5

ES 2 796 560 T3

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

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

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

Gly Glu Ile His His Ser Gly Gly Ala Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

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

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

Arg Gly Gln Gly Lys Asn Trp His Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110

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

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 6

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

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

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

Tyr Lys Ala Ser Ile Leu Lys Ile Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

10

ES 2 796 560 T3

50 55 60

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Ser Arg  
85 90 95

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

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 7

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

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

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

Gly Glu Ile His His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
50 55 60

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

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

Arg Gly Gln Gly Lys Asn Trp Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
100 105 110

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

10

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<221> fuente

ES 2 796 560 T3

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 8

```

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Ser Arg
                85 90 95

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

<210> 9

5 <211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<400> 9

```

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

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

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

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

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 65 70 75 80
    
```

ES 2 796 560 T3

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

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
100 105 110

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Cys Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

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

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

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

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

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

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

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

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

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325 330

<210> 10

<211> 5

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 796 560 T3

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 10

Gly Tyr Tyr Trp Ser  
1 5

5 <210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 11

--- --  
Glu Ile His His Ser Gly Gly Ala Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 12

15 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

20 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 12

Gly Gln Gly Lys Asn Trp His Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 13

<211> 11

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

30 <400> 13

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Ser Trp Leu Ala  
1 5 10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

ES 2 796 560 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

5 <400> 14

Lys Ala Ser Ile Leu Lys Ile  
1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 15

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Ser Arg Thr  
1 5

15

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 16

Gly Tyr Tyr Trp Ser  
1 5

25 <210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 17

Glu Ile His His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 18

35 <211> 13



ES 2 796 560 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

5 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 18

Gly Gln Gly Lys Asn Trp Asn Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr  
1 5 10

<210> 19

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

15 <400> 19

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Ser Trp Leu Ala  
1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 20

Lys Ala Ser Ser Leu Lys Ser  
1 5

25

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 21

Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Ser Arg Thr  
1 5

35 <210> 22

<211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 5 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (7)..(7)  
 10 <223> /reemplazar="Gly"  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> /reemplazar="Thr"  
 15 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 <222> (1)..(9)  
 <223> /nota="Los restos variantes proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para posiciones variantes"  
 20 <400> 22  

Glu	Ile	His	His	Ser	Gly	Ser	Ala	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser
1				5					10					15	

 <210> 23  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <221> fuente  
 <223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"  
 <220>  
 30 <221> VARIANTE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> /reemplazar="Asn"  
 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISC  
 35 <222> (1)..(9)  
 <223> /nota="Los restos variantes proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para posiciones variantes"

ES 2 796 560 T3

<400> 23

Gly Gln Gly Lys Asn Trp His Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 24

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

10 <220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> /reemplazar="Ser"

<220>

15 <221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar="Ser"

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

20 <222> (1)..(9)

<223> /nota="Los restos variantes proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para posiciones variantes"

<400> 24

Lys Ala Ser Ile Leu Lys Ile  
 1 5

25 <210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> VARIANTE

<222> (6)..(6)

35 <223> /reemplazar="Phe"

<220>

ES 2 796 560 T3

<221> CARACTERÍSTICA\_MISC

<222> (1)..(9)

<223> /nota="Los restos variantes proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a los de las anotaciones para posiciones variantes"

5 <400> 25

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Ser Arg Thr  
1 5

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

<210> 27

15 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

20 <223>/nota="Descripción de la Secuencia Artificial: Etiqueta 6xHis sintética"

<400> 27

His His His His His His  
1 5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente a un epítipo de ASCT2, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (las HCDR) de una región variable de la cadena pesada (VH) y tres regiones determinantes de complementariedad de la cadena ligera (las LCDR) de una región variable de la cadena ligera (VL), en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende:
  - (a) una HCDR1 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10; una HCDR2 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11; una HCDR3 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; una LCDR1 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; una LCDR2 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; y una LCDR3 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; o
  - (b) una HCDR1 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16; una HCDR2 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; una HCDR3 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 18; una LCDR1 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; una LCDR2 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20; y una LCDR3 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.
- 15 2. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que
  - (a) el VH comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y en el que el VL comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;
  - (b) el VH comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y en el que el VL comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4;
  - 20 (c) el VH comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, y en el que el VL comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; o
  - (d) el VH comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y en el que el VL comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.
- 25 3. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y el VL comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.
4. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el VH comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y el VL comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.
- 30 5. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una región constante de IgG que comprende una inserción de cisteína (C) entre la serina (S) en la posición 239 y la valina (V) en la posición 240, en el que la numeración corresponde al índice EU en Kabat.
- 35 6. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el anticuerpo comprende una cadena pesada de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.
7. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que, tras la unión del anticuerpo a ASCT2 en la superficie celular, el anticuerpo se internaliza en la célula.
8. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende una región constante de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en una región constante de kappa humana y una región constante de lambda humana.
- 40 9. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el anticuerpo comprende una región constante de kappa humana de la SEQ ID NO: 26.
10. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, conjugado adicionalmente con una citotoxina seleccionada del grupo que consiste en un agente antimicrobiano, un agente terapéutico, un profármaco, un péptido, una proteína, una enzima, un lípido, un modificador biológico de la respuesta, un agente farmacéutico, una linfocina, un anticuerpo heterólogo, un fragmento de un anticuerpo heterólogo, un marcador detectable, un polietilenglicol (PEG), un radioisótopo y una combinación de dos o más de dichas citotoxinas.
- 45 11. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 10, que está conjugado con una
- 50 citotoxina.

12. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la citotoxina se selecciona de un derivado de tubulisina y una pirrolobenzodiazepina.
13. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el derivado de tubulisina es tubulisina AZ1508.
- 5 14. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la pirrolobenzodiazepina se selecciona de SG3315 y SG3249.
15. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que el anticuerpo se une a ASCT2 humana y ASCT2 de mono cinomolgo.
- 10 16. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el anticuerpo no se une específicamente a ASCT1 humana.
17. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
18. Un polinucleótido o combinación de polinucleótidos que codifican el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
- 15 19. Un método de preparación de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende cultivar un hospedador que comprende un polinucleótido de la reivindicación 18.
- 20 20. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, o una composición farmacéutica de la reivindicación 17 para uso en el tratamiento de un cáncer caracterizado por sobreexpresión de ASCT2, en el que dicho tratamiento comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad efectiva de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o dicha composición farmacéutica.

FIG. 1A

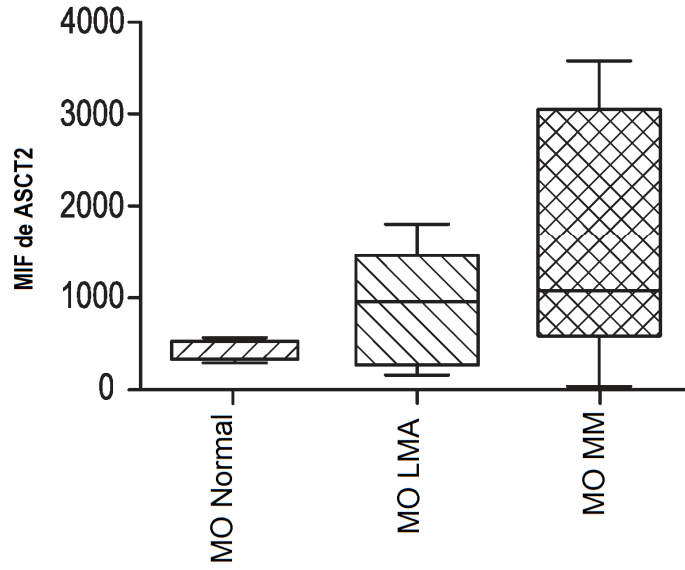
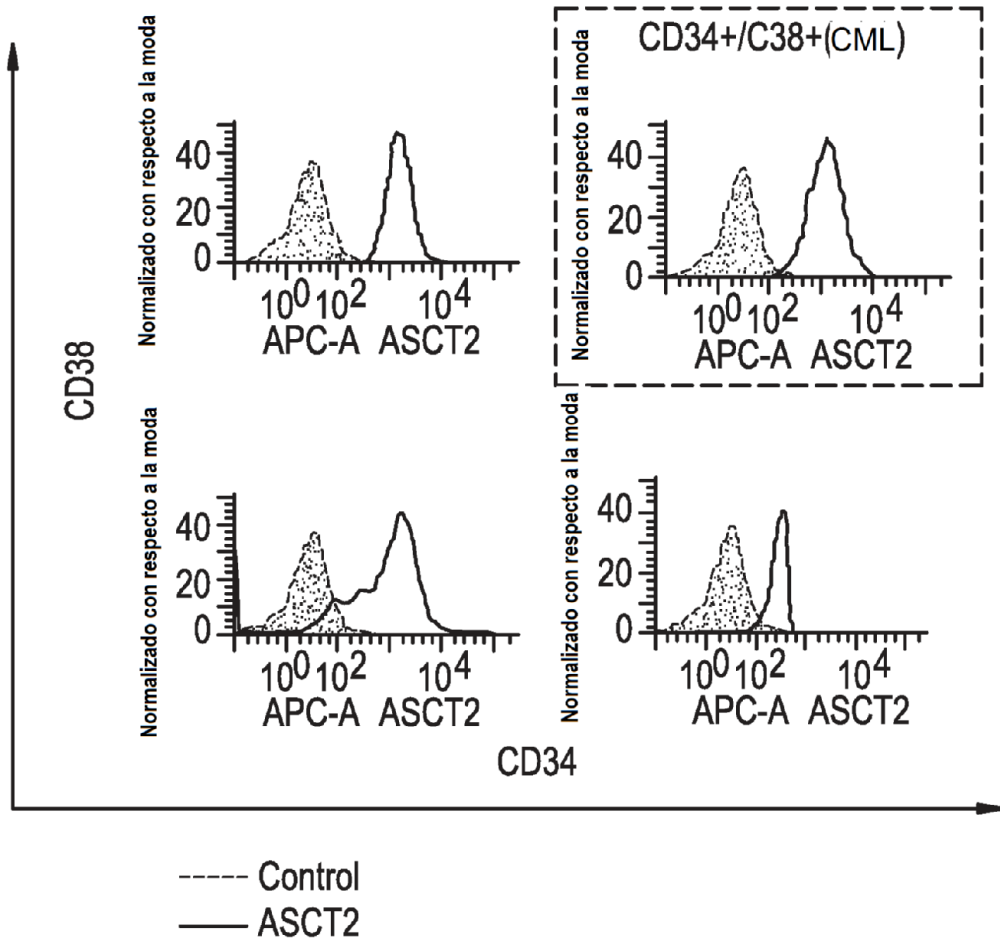
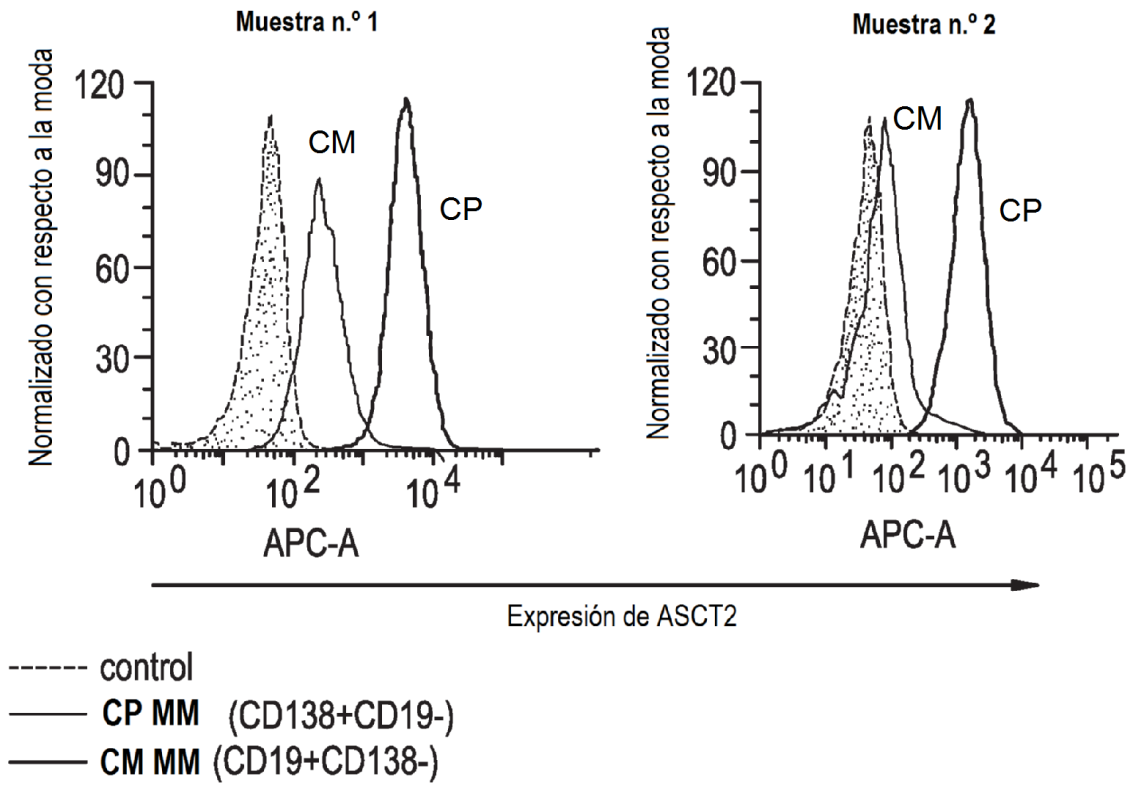


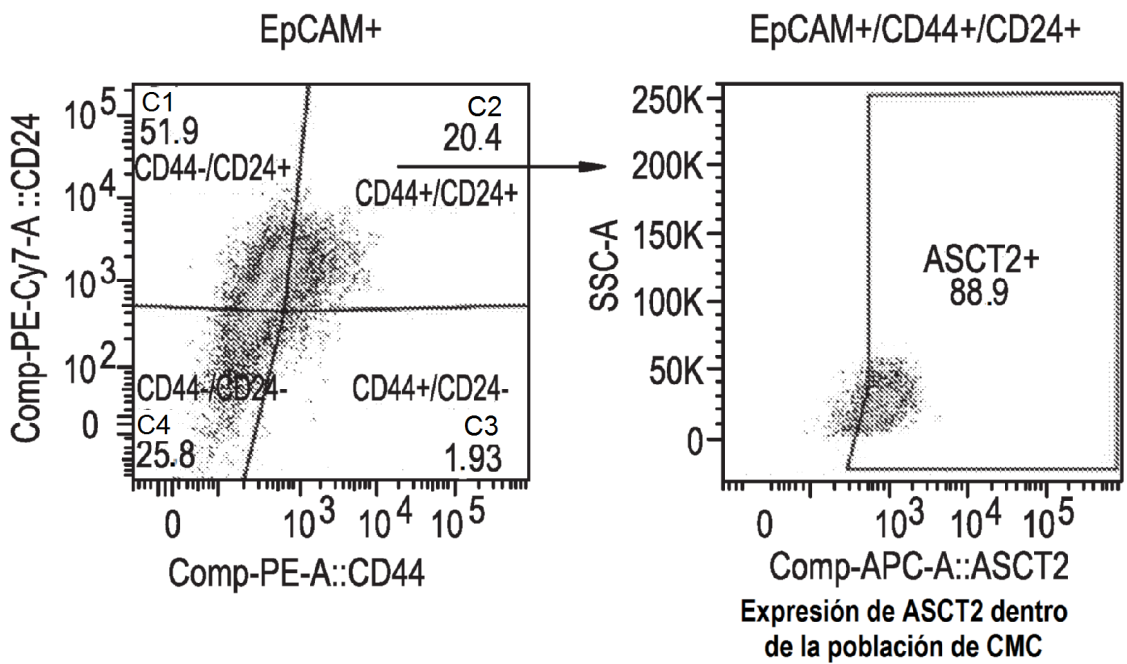
FIG. 1B



**FIG. 1C**



**FIG. 1D**





# FIG. 1E

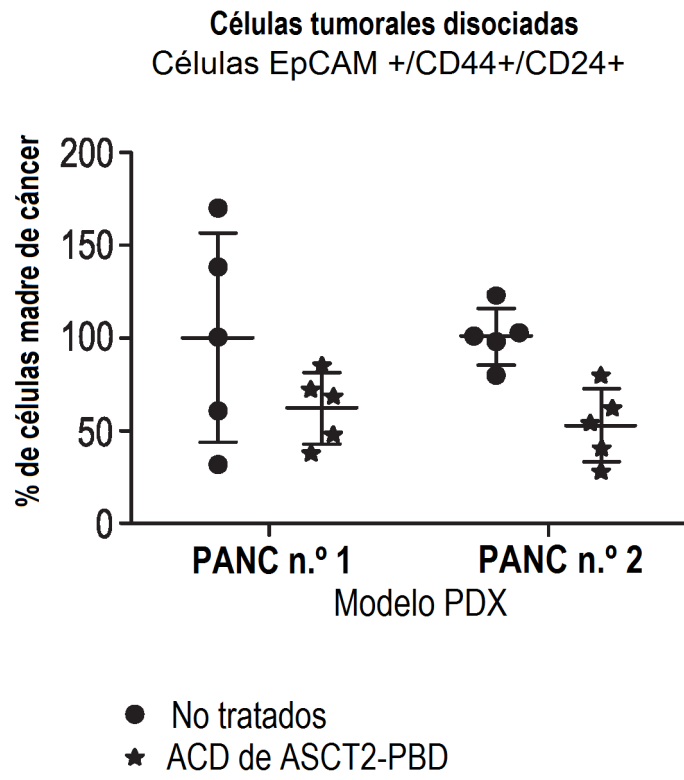


FIG. 2

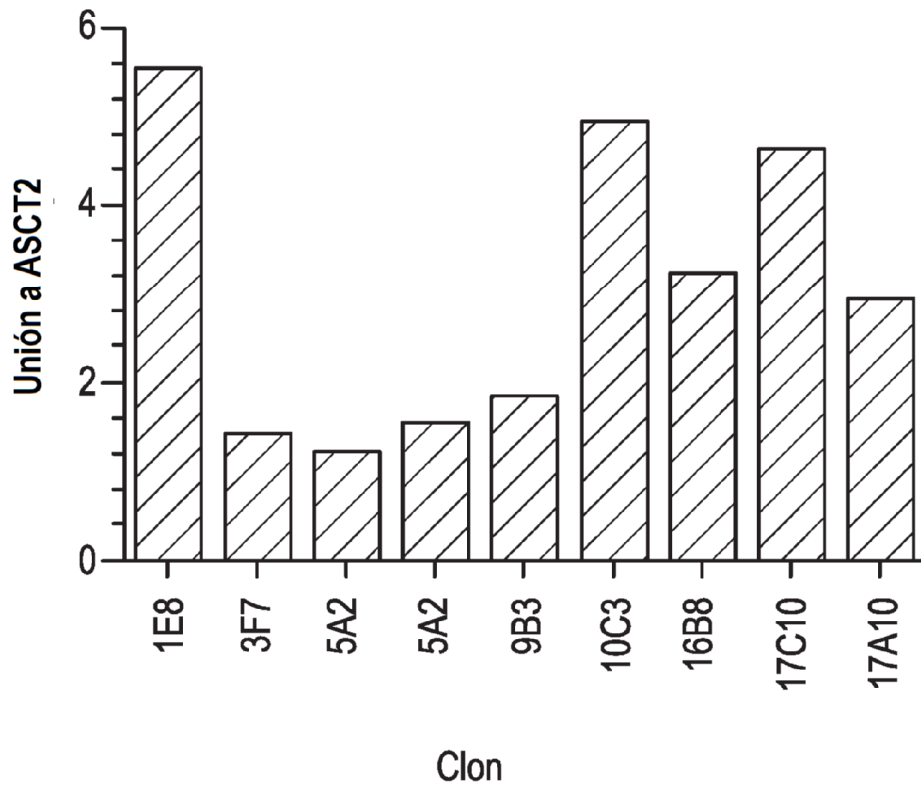


FIG. 3A

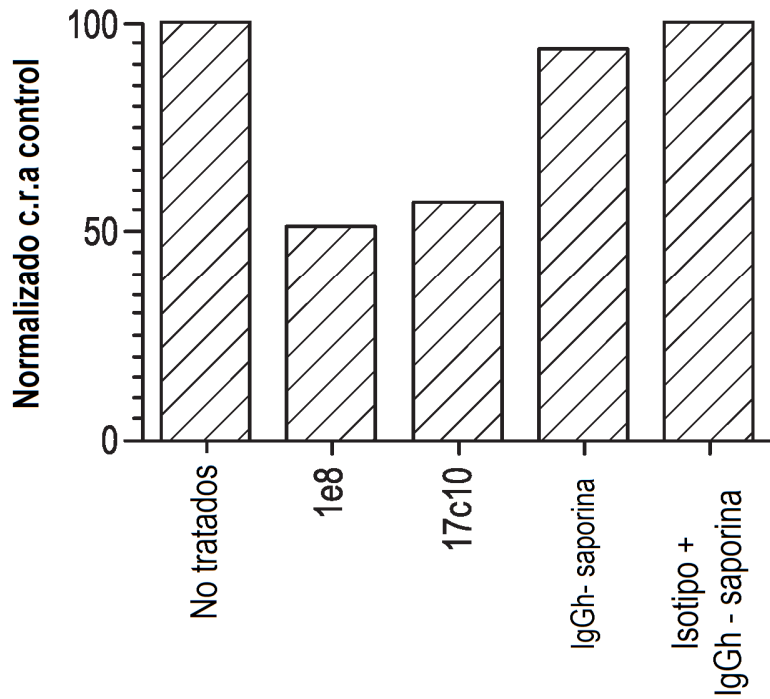


FIG. 3B

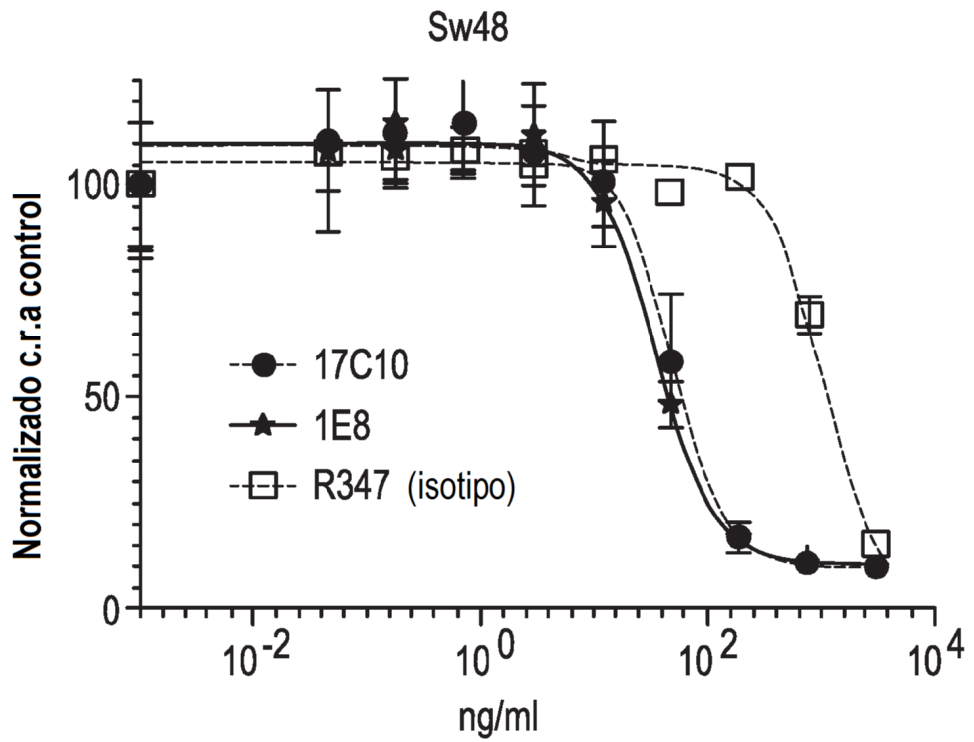


FIG. 4

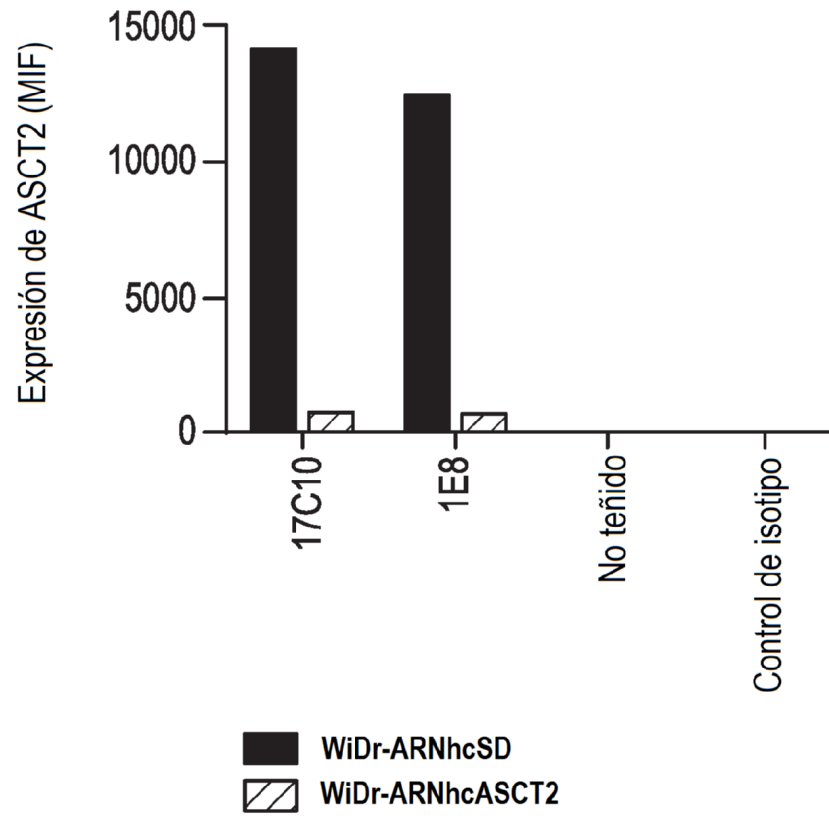


FIG. 5A

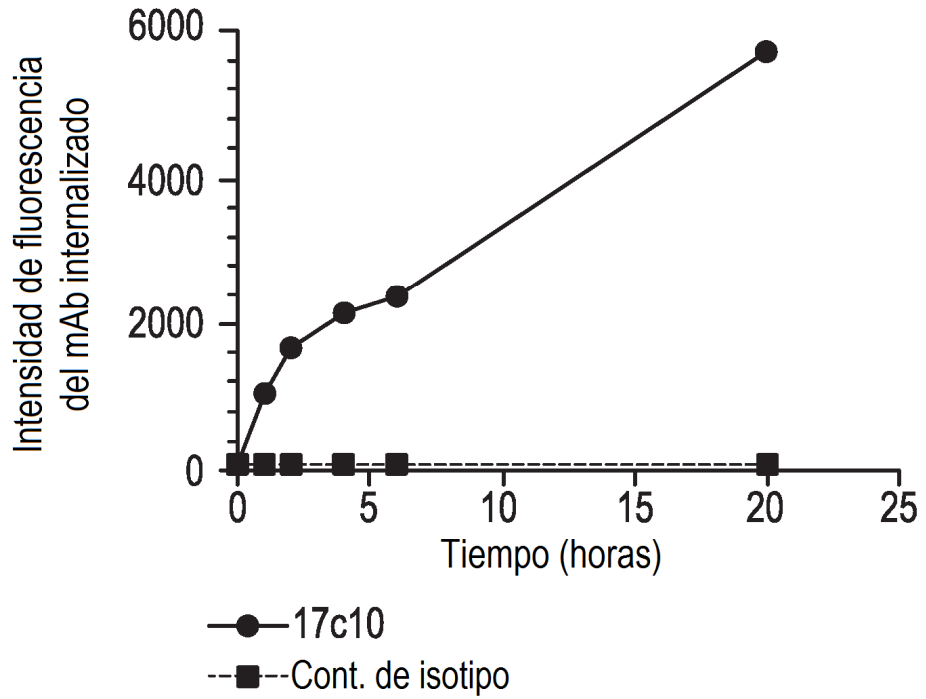


FIG. 5B

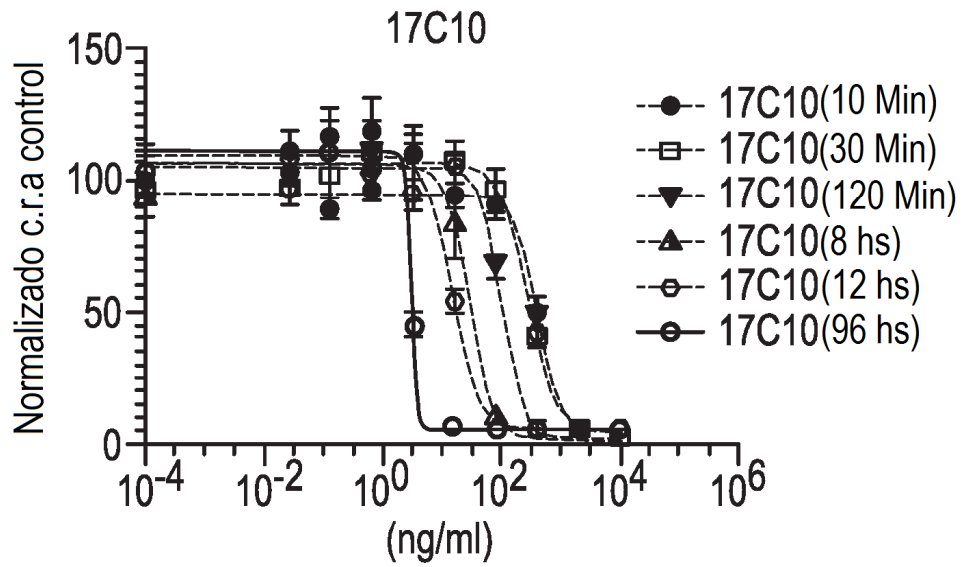


FIG. 6A

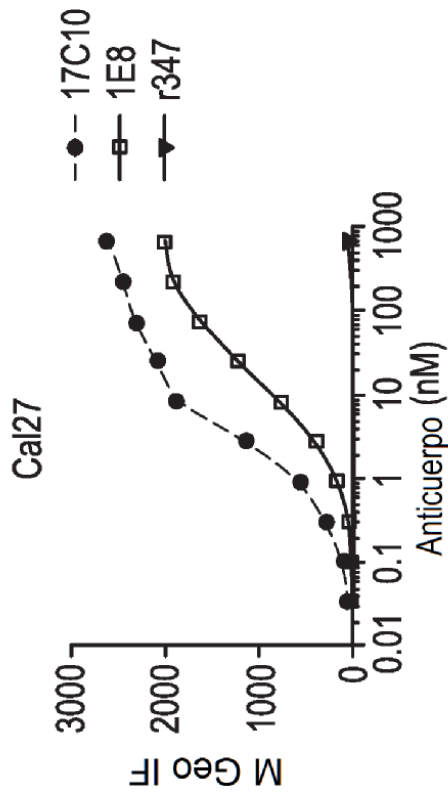


FIG. 6B

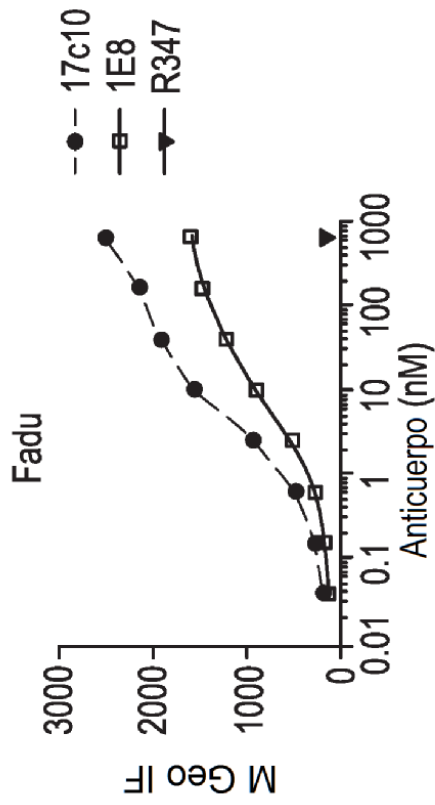


FIG. 6C

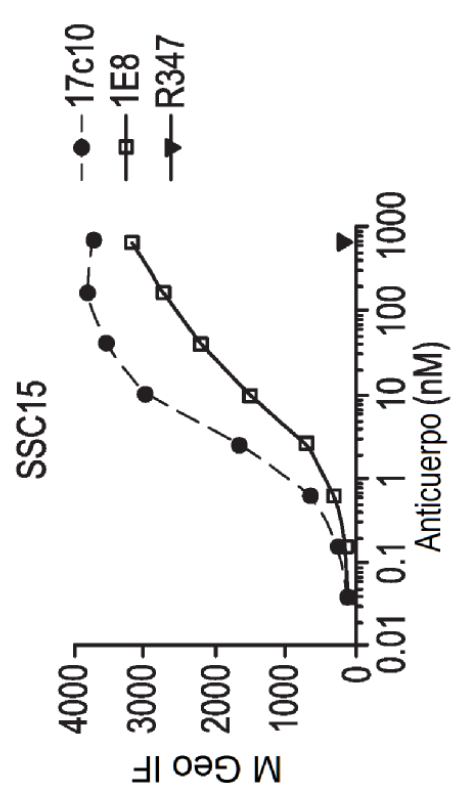


FIG. 6D

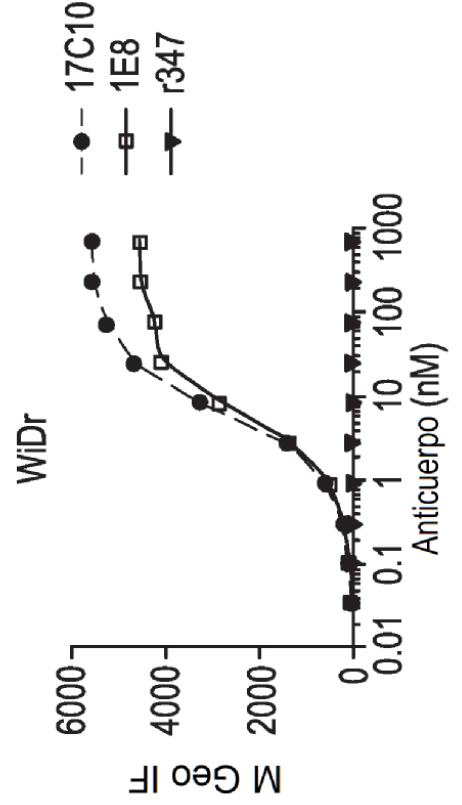


FIG. 6E

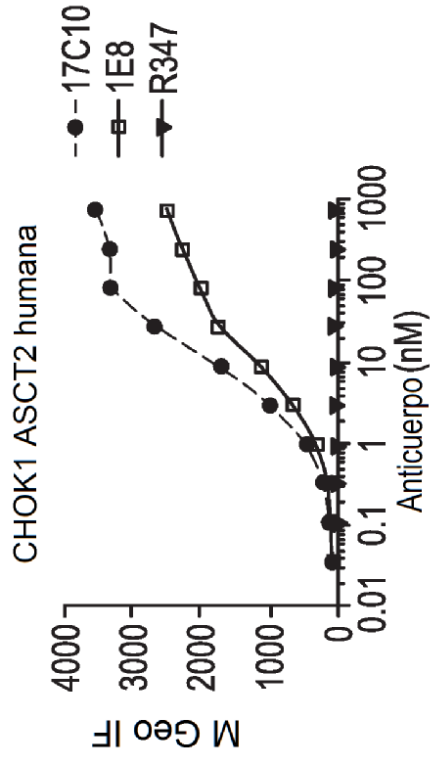


FIG. 6F

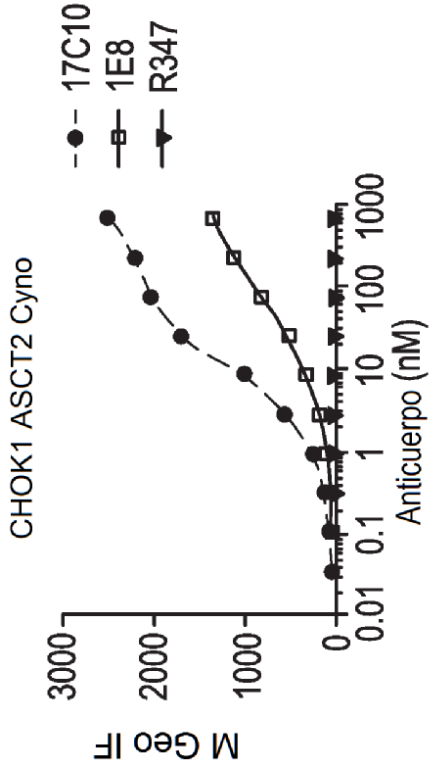


FIG. 6G

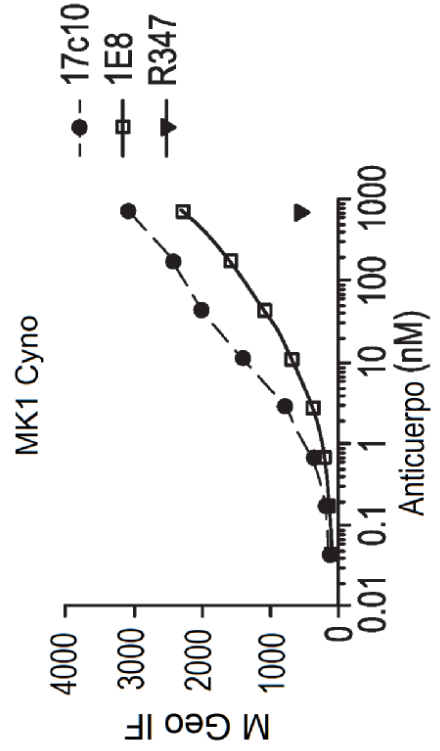


FIG. 6H

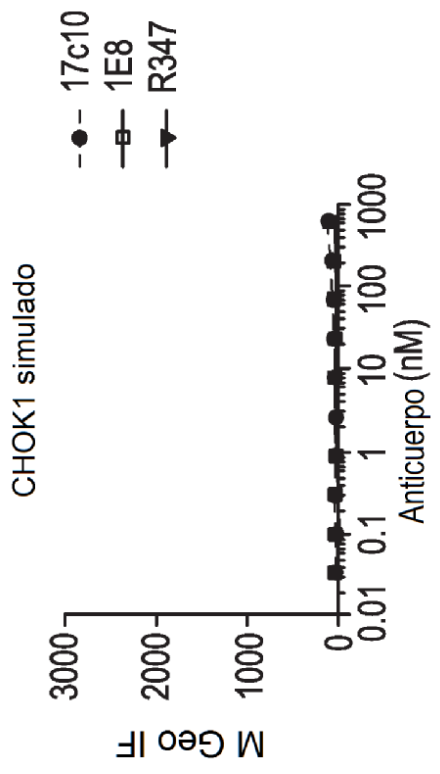


FIG. 7A

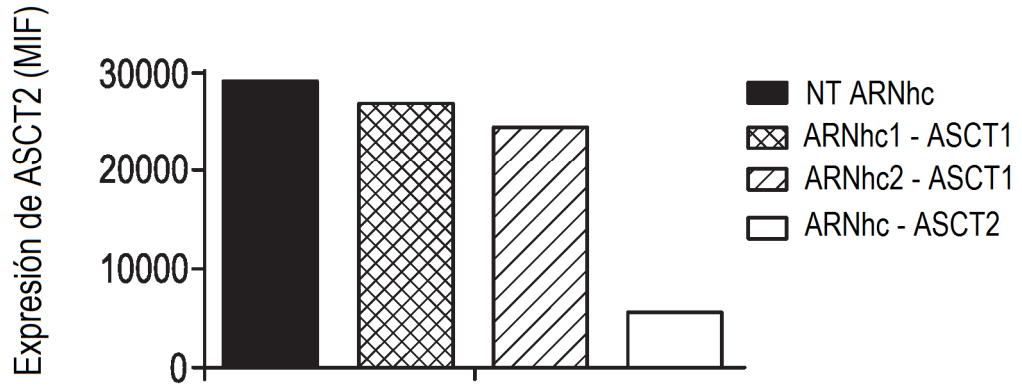
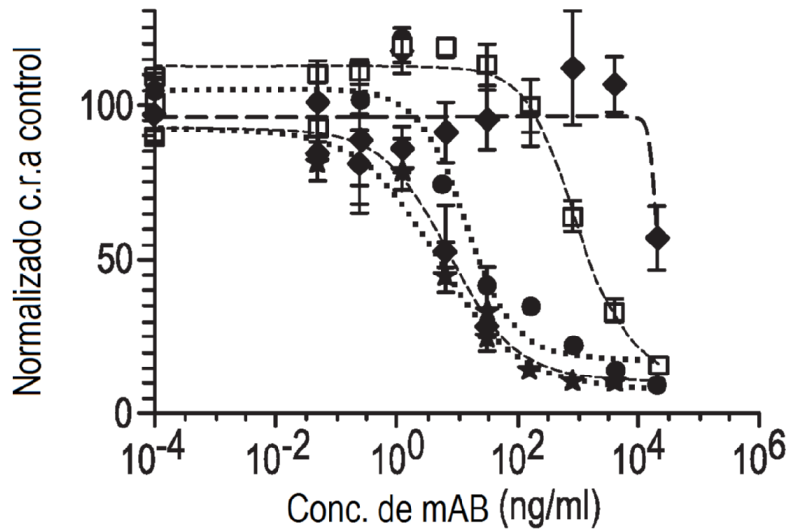


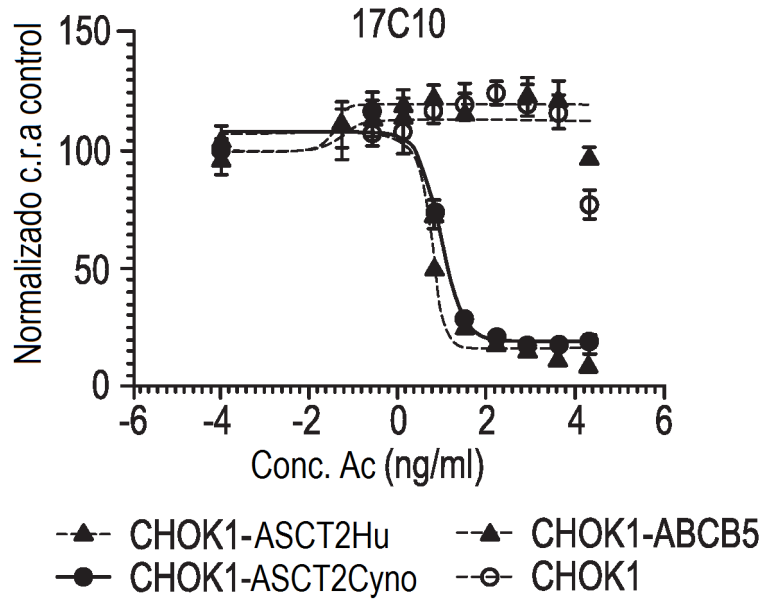
FIG. 7B  
SKMEL-2



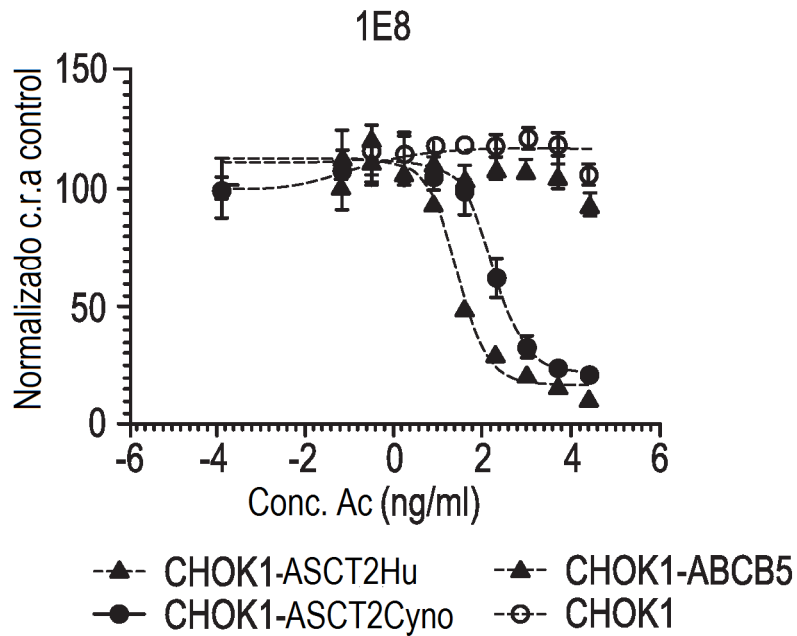
- ARNhc/ADC de 17C10 NT
- ◆— ARNhc/ADC de isotipo NT
- ★— ARNhc(1) de ASCT1/ ACD de 17C10
- ★— ARNhc(2) de ASCT1/ ACD de 17C10
- ARNhc de ASCT2/ ACD de 17C10

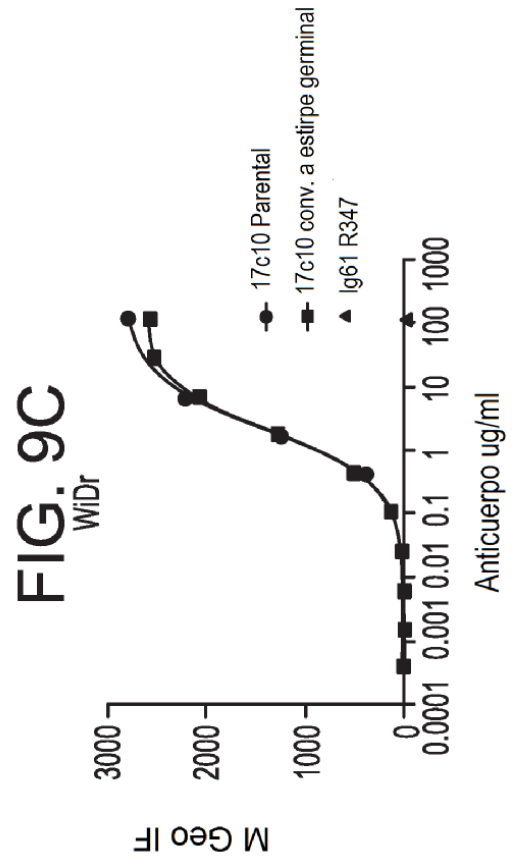
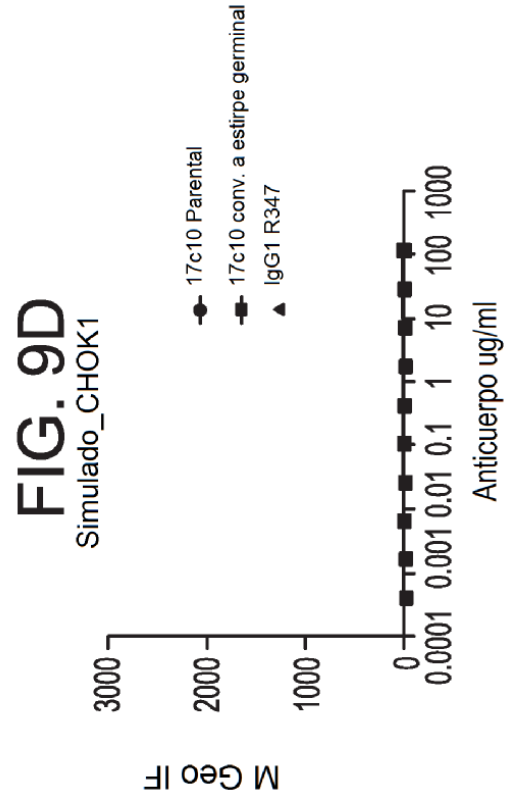
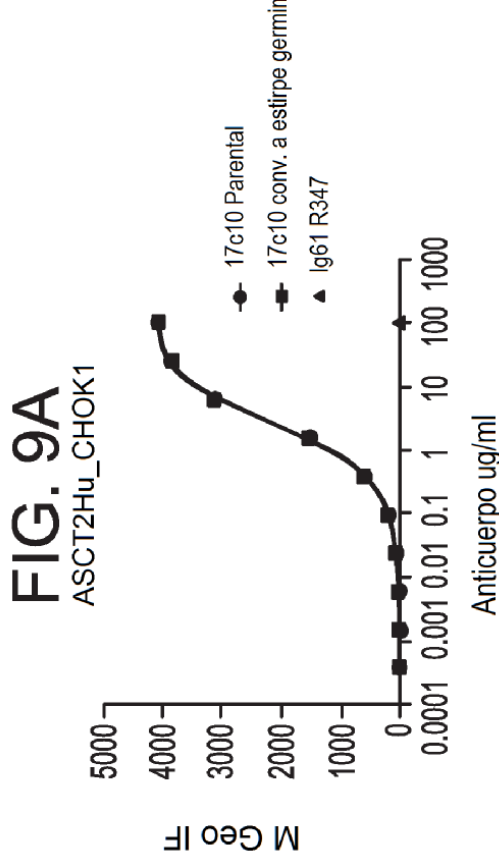
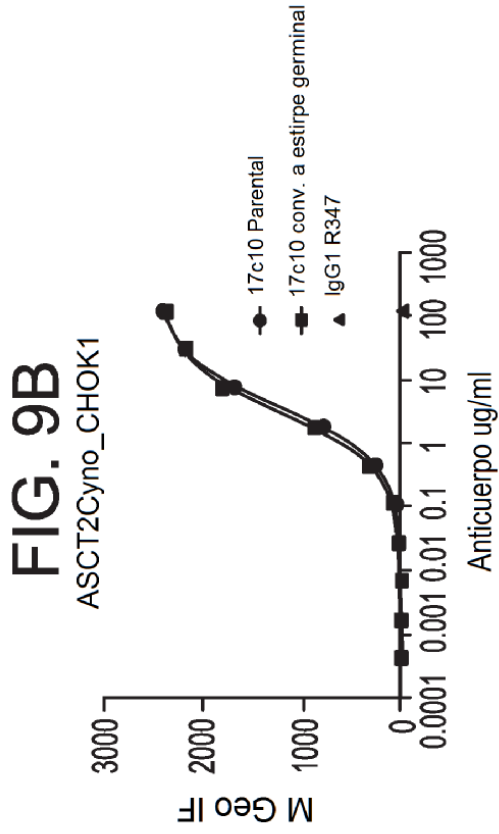


**FIG. 8A**

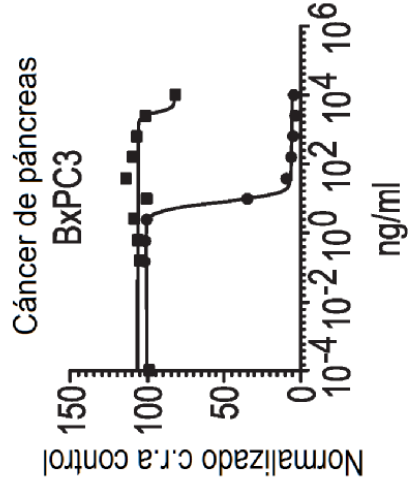


**FIG. 8B**

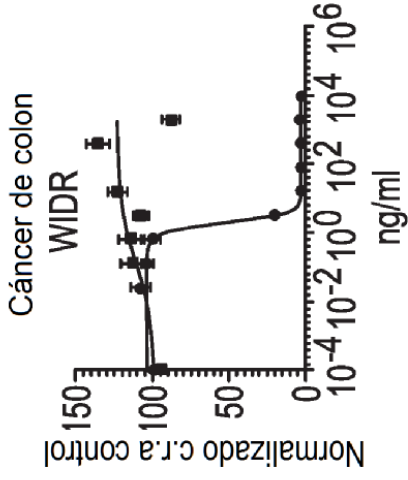




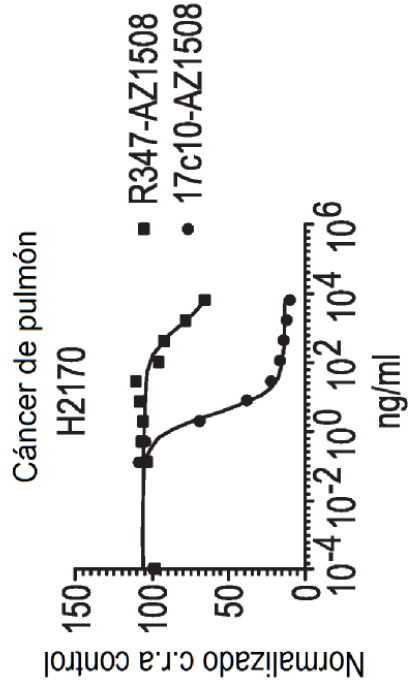
**FIG. 10A**



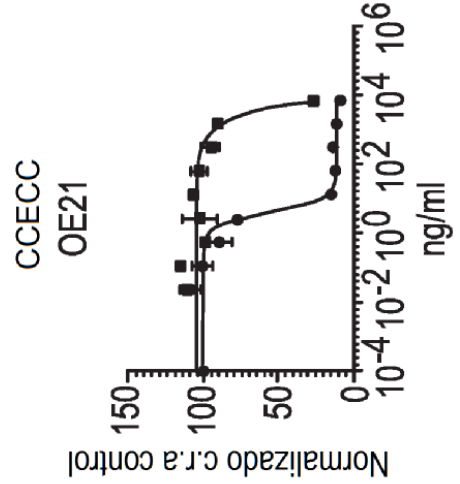
**FIG. 10B**



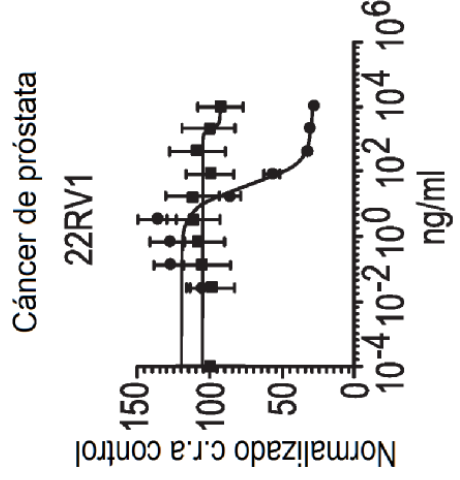
**FIG. 10C**



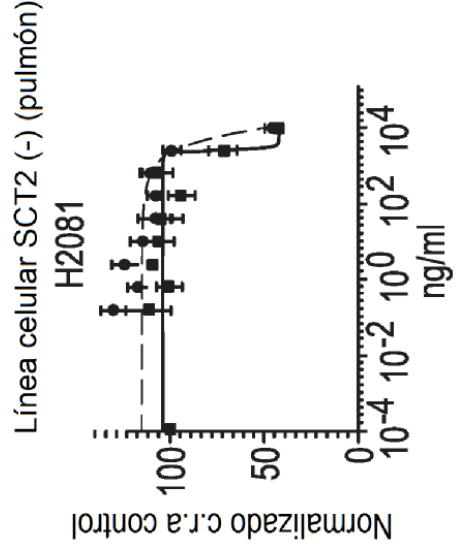
**FIG. 10D**



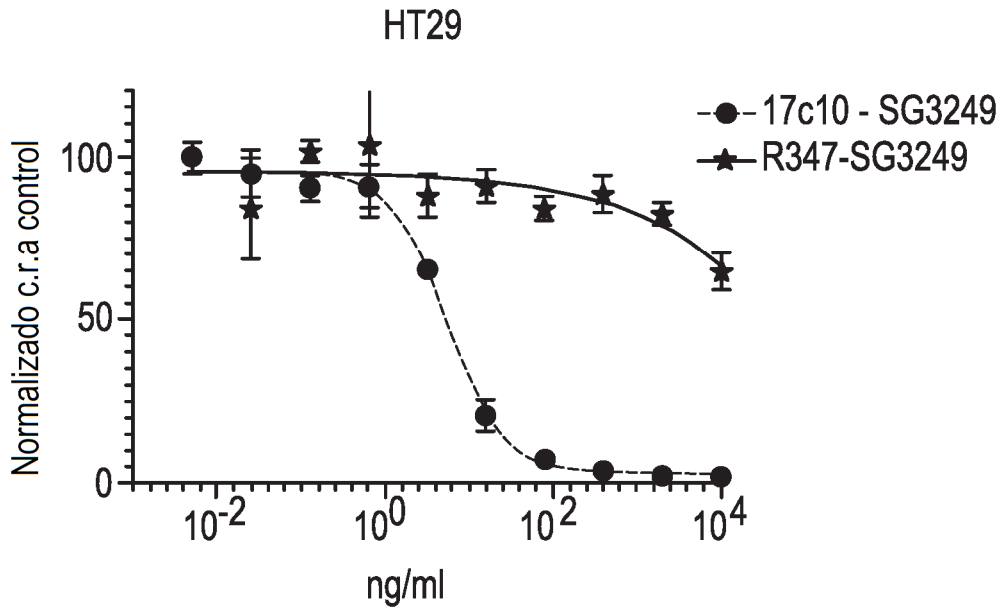
**FIG. 10E**



**FIG. 10F**



# FIG. 11A



# FIG. 11B

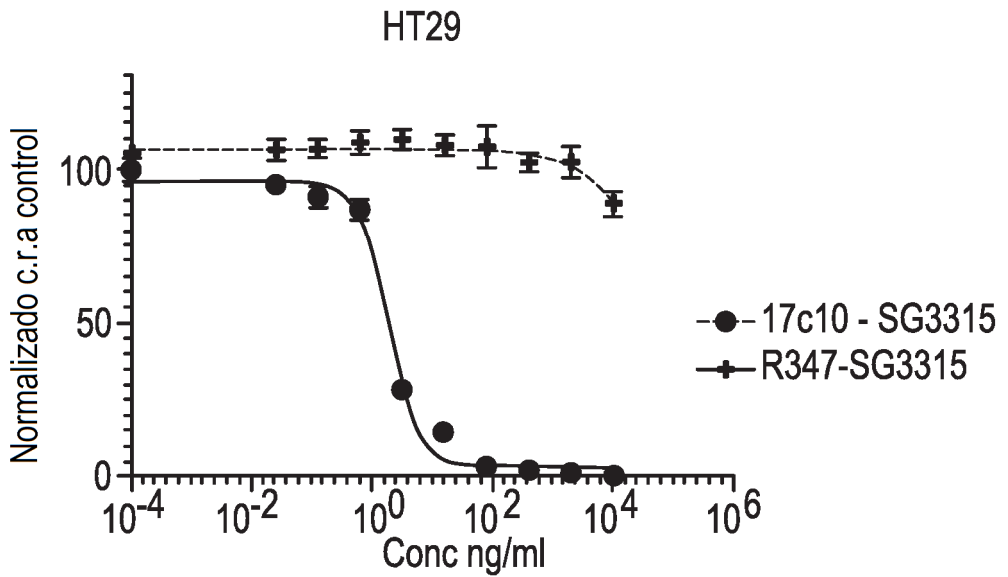
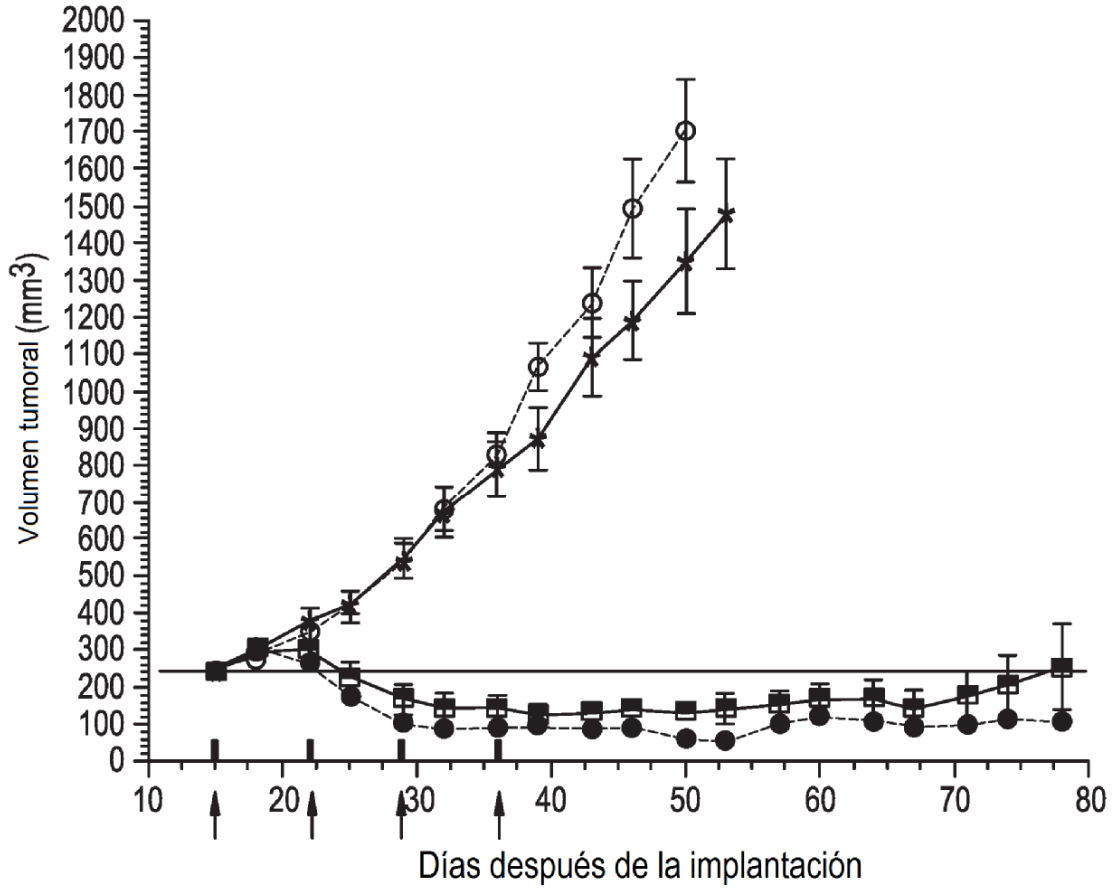
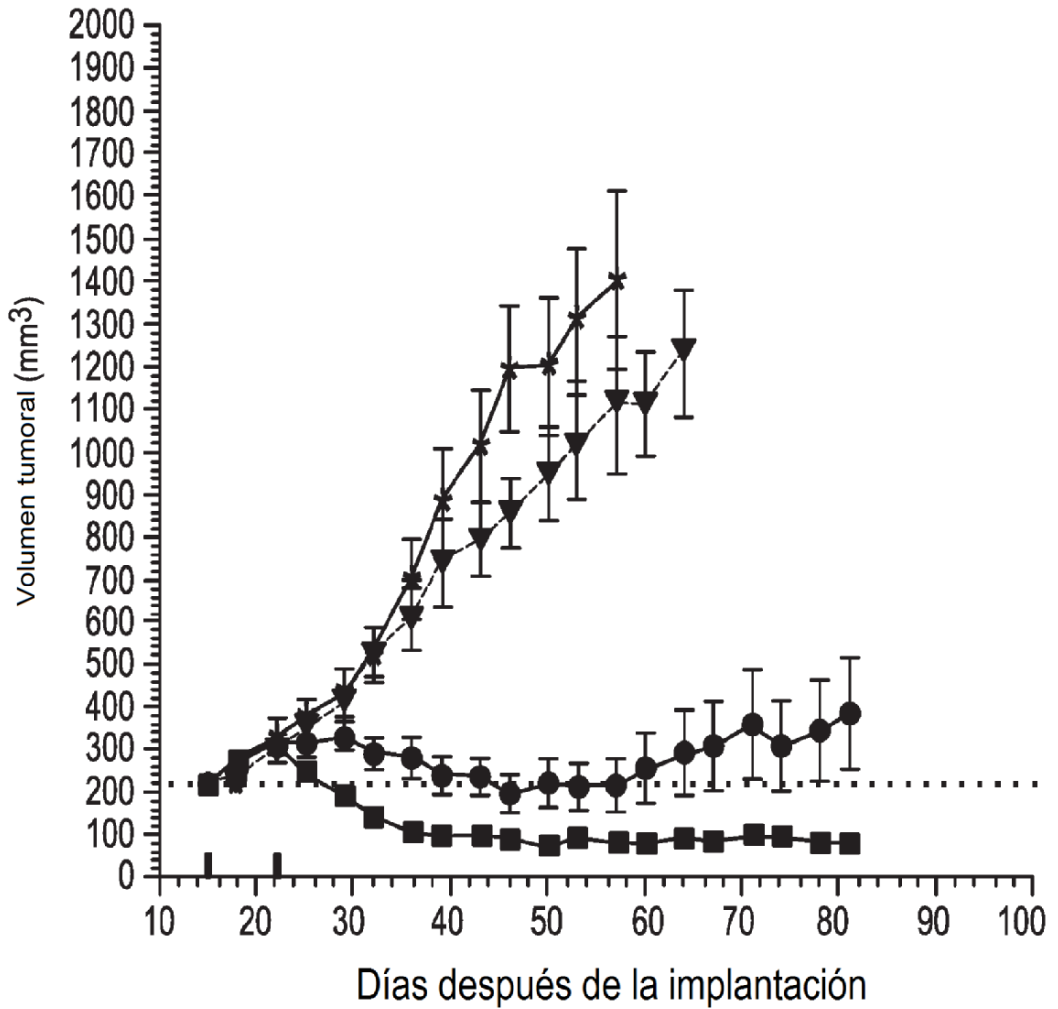


FIG. 12A



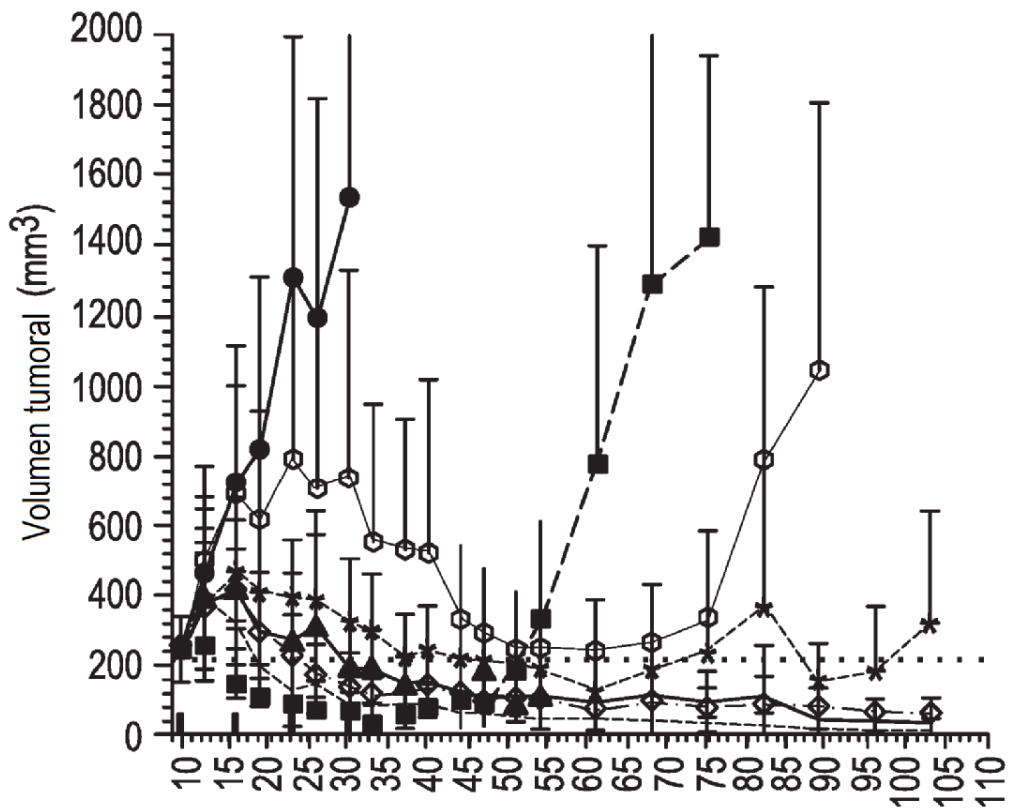
-○- No tratado  
 -\* R347-239i-AZ1508(5 mg/kg)  
 -■- 17C10-239i-AZ1508(3 mg/kg)  
 -●- 17C10-239i-AZ1508(5 mg/kg)  
*dosificación i.v (Q1W) - Días 15, 22, 29, 36*

FIG. 12B



- \*— No tratado
  - ▼— R347-239i-SG3315 (Q1W)
  - 17C10-239i-SG3315 (1 mg/kg, Q1W)
  - 17C10-239i-SG3315 (0.3 mg/kg, Q1W)
- dosificación i.v (Q1W) - Días 15, 22, 29, 36*

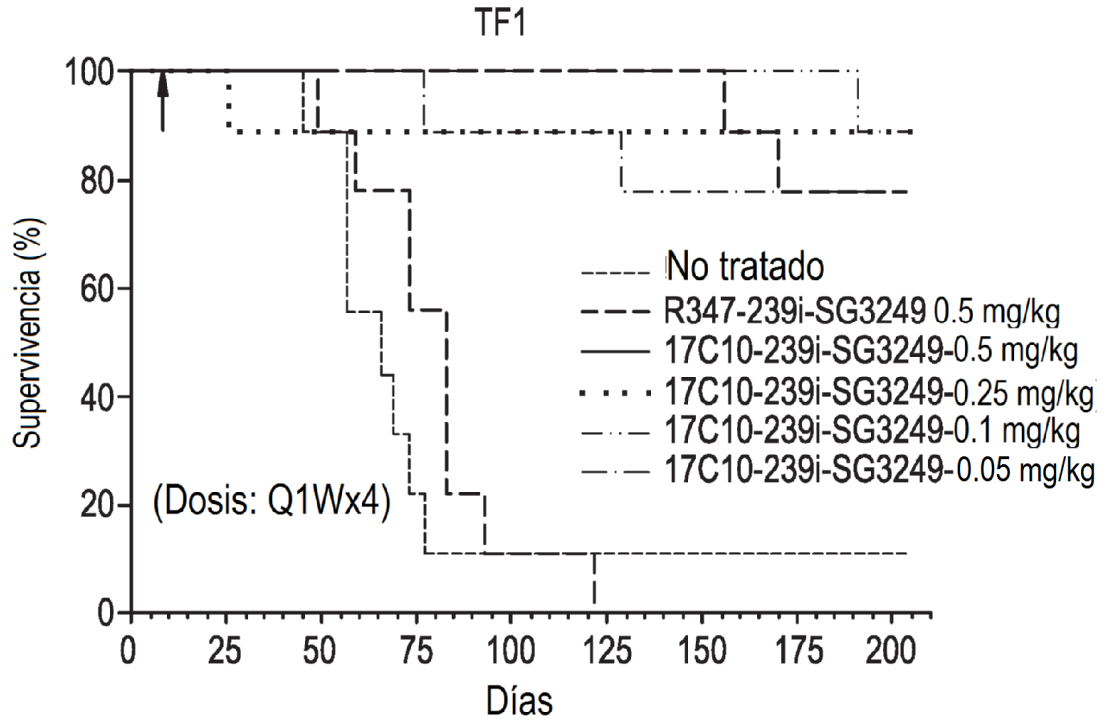
FIG. 12C



Días después de la implantación

- No tratado
- R347-239i-SG3249 0.4 mg/kg
- Gemzar
- ▲ 17C10-239i-SG3249-0.2 mg/kg
- ◇ 17C10-239i-SG3249-0.1 mg/kg
- ◊ 17C10-239i-SG3249-0.3 mg/kg
- \* 17C10-239i-SG3249-0.4 mg/kg

**FIG. 13A**



**FIG. 13B**

