

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 508**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/50 (2007.01)
A61K 31/5365 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2015** **PCT/IB2015/058801**
87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016** **WO16075670**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2015** **E 15798251 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024** **EP 3218410**

54 Título: **Conjugados de anticuerpos y fármacos**

30 Prioridad:

14.11.2014 US 201462079942 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
15.11.2024

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

ABRAMS, TINYA;
COHEN, STEVEN;
DAMIANO, JASON;
DÜRR, CLEMENS;
HUBER, THOMAS;
MENEZES, DANIEL;
MILLER, KATHY;
RENDAHL, KATHERINE y
RONDEAU, JEAN-MICHEL RENE

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 987 508 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

Conjugados de anticuerpos y fármacos

5 Campo de la invención

Lista de Secuencias

10 La presente solicitud contiene una Lista de secuencias que ha sido presentada electrónicamente en formato ASCII y que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII, creada el 12 de noviembre de 2015, se denomina PAT056506-WO-PCT_SL.txt y tiene un tamaño de 146.966 bytes.

Campo de la invención

15 La presente invención se refiere en general a anticuerpos anti-P-cadherina, fragmentos de anticuerpos, conjugados de anticuerpos y fármacos y sus usos para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

20 P-cadherina

25 Las cadherinas clásicas representan una familia de moléculas de adhesión celular expresadas en uniones de tipo adherente que median en los contactos entre células dependientes de calcio. La cadherina placentaria (P-cadherina; que también se conoce como cadherina 3, tipo 1 o "CDH3") tiene una expresión restringida en tejidos normales, pero se sabe que se expresa en tipos celulares indiferenciados o poco diferenciados de varios tejidos, incluidas las células epiteliales basales de la piel, el esófago, los pulmones y la cavidad bucal. (véase, p. ej., Albergaria *et al.*, *Int. J. Dev. Biol.* 55:811-822 (2011)).

30 La estructura de la P-cadherina consta de 3 dominios distintos: un dominio extracelular (DEC) que contiene cinco repeticiones de cadherina en tándem, un dominio transmembrana y una cola intracelular que contiene un dominio de unión a catenina. El DEC media en las interacciones en *cis* y *trans* entre múltiples moléculas de P-cadherina, mientras que el dominio de unión a catenina une la P-cadherina a proteínas tales como la catenina p120 y, en consecuencia, a elementos citoesqueléticos celulares. (véase, por ejemplo, Wu *et al.*, *PNAS* 107:17592-7 (2010)).

35 P-cadherina y cáncer

40 También se sabe que la P-cadherina (que también se denomina "Pcad", "PCad", "P-Cad o CDH3") está sobreexpresada en varios tumores malignos, incluidos el cáncer de mama, gástrico, endometrial, de cabeza y cuello y colorrectal, entre otros. La sobreexpresión de P-cadherina en algunos tumores de mama, endometrio, ovario, colorrectal y vejiga también se ha correlacionado con un peor pronóstico en comparación con los casos donde los niveles de expresión de P-cadherina son bajos o están ausentes. En el cáncer de mama, la P-cadherina se sobreexpresa con frecuencia en carcinomas invasivos de alto grado y es un marcador fiable de tumores de tipo basal. (véase, p. ej., Paredes *et al.*, *Br. Can. Res.* 9:214-226 (2007); Sanders *et al.*, *Int. J. Can.* 79:573-579 (1998); Albergaria *et al.*, *Int. J. Dev. Biol.* 55:811-822 (2011); Sousa *et al.*, *Histol. Histopathol.* 25:963-975 (2010))

45 En determinados tipos de cáncer, tales como el cáncer de mama y de ovario, se sabe que la P-cadherina promueve la motilidad, la invasividad y la metástasis de las células tumorales (véase, p. ej., Cheung *et al.*, *Oncogene* 30:2964-74 (2011); Ribeiro *et al.*, *Oncogene* 29: 392-402 (2010)).

50 Se sabe que numerosos procesos relevantes para el cáncer promueven la expresión de la proteína y el ARNm de P-cadherina. La inactivación del supresor tumoral BRCA1 mediante mutación o pérdida de expresión se ha asociado con una mayor expresión de P-cadherina tanto en estirpes celulares de cáncer de mama como en muestras de pacientes. También se sabe que el factor de transcripción C-EBP β y el antiestrógeno ICI182780 (fulvestrant) desregulan la expresión de P-cadherina e inducen su regulación positiva en las células tumorales, al igual que la hipometilación del promotor de CDH3 a través de otros procesos. En el rabdomiosarcoma alveolar, los factores de transcripción oncogénicos quiméricos PAX3-FOXOA1 y PAX7-FOXOA1 (resultantes de translocaciones) inducen directamente la expresión de P-cadherina, lo que aumenta la agresividad del tumor. (véase, p. ej., Albergaria *et al.*, *Int. J. Dev. Biol.* 55:811-822 (2011); Thuault *et al.*, *Oncogene* 15:1474-86 (2012); Ames *et al.*, *Clin. Can. Res.* 11:4003-11 (2005); Gorski *et al.*, *Br. Can. Res. Treat.* 122:721-31 (2010); Paredes *et al.*, *Clin. Can. Res.* 11:5869-5877 (2005); Albergaria *et al.*, *Human Mol. Gen.* 19:2554-2566 (2010)).

60 El documento EP2634194A1 desvela diversos anticuerpos contra la P-cadherina que se unen al EC1, es decir, los restos de aminoácidos 108-236 de P-cadherina, algunos de los cuales, es decir, PPAT-055-09C y PPAT-055-24C, están conjugados con sulfo-SMCC ligado a DM1 y se utilizan para el tratamiento del cáncer.

65 Conjugados de anticuerpos y fármacos

Los conjugados de anticuerpos y fármacos ("CAF") se han utilizado para la administración local de agentes citotóxicos en el tratamiento del cáncer (véase, p. ej., Lambert, *Curr. Opinion In Pharmacology* 5:543-549, 2005). Los CAF permiten la administración dirigida de la porción farmacológica donde se puede lograr la máxima eficacia con una toxicidad mínima. A medida que más CAF muestran resultados clínicos prometedores, existe una mayor necesidad de desarrollar nuevos tratamientos para la terapia antineoplásica. Asimismo, no todos los intentos de fabricar CAF terapéuticamente eficaces para dianas cancerosas conocidas han tenido éxito. Los ejemplos de factores que pueden afectar a la eficacia terapéutica de los CAF incluyen la afinidad, la capacidad de un anticuerpo para conjugarse, la capacidad de escisión o la estabilidad del conector; la estabilidad del conjugado de anticuerpo y fármaco, la tendencia de un conjugado de anticuerpo y fármaco a agregarse y la relación de las moléculas de fármaco/carga útil que se conjugan con cada anticuerpo ("RFA" o "relación fármaco/anticuerpo").

La agregación y la falta de estabilidad pueden aumentar la posibilidad de reacciones adversas a los conjugados de anticuerpos y fármacos en un entorno clínico, reducir la eficacia y aumentar el coste de fabricación de los CAF.

Por lo tanto, existe la necesidad de moléculas de CAF terapéuticamente eficaces.

Compendio de la invención

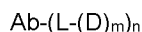
La presente invención proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a P-cadherina humana que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de la SEQ ID NO: 1, una CDR2 VH de la SEQ ID NO: 2 y una CDR3 VH de la SEQ ID NO: 3, en donde la CDR se define de acuerdo con la definición de Kabat; y una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de la SEQ ID NO: 11, una CDR2 VL de la SEQ ID NO: 12 y una CDR3 VL de la SEQ ID NO: 13, en donde la CDR se define de acuerdo con la definición de Kabat.

En una realización, la presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a P-cadherina que comprenden una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

En otras realizaciones, la presente invención también proporciona anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen a P-cadherina que comprenden una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19.

En algunas realizaciones, los anticuerpos contra P-cadherina, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, son anticuerpos humanos o humanizados. En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son anticuerpos monoclonales. En realizaciones adicionales, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son anticuerpos monocatenarios (scFv).

La presente invención también proporciona conjugados de anticuerpos y fármacos (CAF) que comprenden la fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma; en donde:

Ab es un anticuerpo contra P-cadherina, o un fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención como se desvela en el presente documento; L es un conector; D es una porción farmacológica; m es un número entero entre 1 y 8; y n es un número entero entre 1 y 10. En algunas realizaciones, m es 1. En otras realizaciones, n es 3 o 4.

En algunas realizaciones, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, del CAF comprende una región VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una región VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

En una realización adicional, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, del conjugado de fármaco y anticuerpo comprende una región VH que comprende: (a) una CDR1 VH de la SEQ ID NO: 1, (b) una CDR2 VH de la SEQ ID NO: 2, (c) una CDR3 VH de la SEQ ID NO: 3 y una región VL que comprende (d) una CDR1 VL de la SEQ ID NO: 11, (e) una CDR2 VL de la SEQ ID NO: 12 y (f) una CDR3 VL de la SEQ ID NO: 13, en donde la CDR se define de acuerdo con la definición de Kabat.

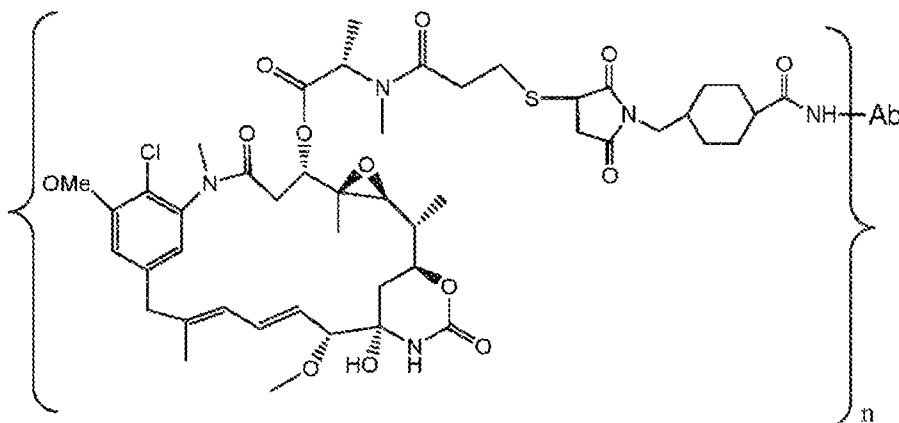
En otras realizaciones, el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, del conjugado de anticuerpo y fármaco comprende una cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera de la SEQ ID NO: 19.

En realizaciones adicionales, el conector del conjugado de anticuerpo y fármaco se selecciona del grupo que consiste en un conector escindible, un conector no escindible, un conector hidrófilo, un conector procargado y un conector basado en

el ácido dicarboxílico. En algunas realizaciones, el conector procede de un reactivo de reticulación seleccionado del grupo que consiste en N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB), N-succinimidil yodoacetato (SIA), N-succinimidil (4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB), maleimida PEG NHS, N-succinimidil 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-sulfosuccinimidil 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (sulfo-SMCC) y 2,5-dioxopirrolidin-1-il 17-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetraazaheptadecan-1-oato (CX1-1).

En algunas realizaciones, la porción farmacológica del conjugado de anticuerpo y fármaco se selecciona de un grupo que consiste en un inhibidor de la V-ATPasa, un agente proapoptótico, un inhibidor de Bcl2, un inhibidor de MCL1, un inhibidor de HSP90, un inhibidor de IAP, un inhibidor de mTor, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, una dolastatina, un maitansinoide, una MetAP (metionina aminopeptidasa), un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, inhibidores de proteasomas, inhibidores de reacciones de transferencia de fosforilo en las mitocondrias, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de cinasas, un inhibidor de CDK2, un inhibidor de CDK9, un inhibidor de cinesina, un inhibidor de HDAC, un agente que daña el ADN, un agente alquilante de ADN, un intercalante de ADN, un agente de unión al surco menor del ADN y un inhibidor de DHFR. En realizaciones adicionales, el agente citotóxico es un maitansinoide. En realizaciones específicas, el maitansinoide es N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1) o N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4).

En una realización específica, el conjugado de anticuerpo y fármaco tiene la siguiente fórmula:



en donde el Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2, una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 y una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 11, una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 12, una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 13, en donde la CDR se define de acuerdo con la definición de Kabat; y n es de 1 a 10; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos contra P-cadherina humana o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención como se desvela en el presente documento, o conjugados de anticuerpos y fármacos que comprenden estos anticuerpos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se preparan como un liofilizado. En realizaciones adicionales, el liofilizado comprende los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de los mismos o conjugados de anticuerpos y fármacos de estos anticuerpos, histidina, sacarosa y polisorbato 20. En una realización específica, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 10 mg/ml del conjugado de anticuerpo y fármaco desvelado en el presente documento, histidina 20 mM, sacarosa 240 mM y polisorbato 20 al 0,02 %.

La presente solicitud también desvela métodos para tratar el cáncer en un paciente que lo necesite, que comprenden administrar a dicho paciente los conjugados de anticuerpos y fármacos o la composición farmacéutica desvelada en el presente documento. En algunas realizaciones de los métodos desvelados, los métodos comprenden administrar el conjugado de anticuerpo y fármaco o la composición farmacéutica al paciente en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales.

En otras realizaciones, esta presente invención proporciona conjugados de anticuerpos y fármacos contra P-cadherina o las composiciones farmacéuticas según la invención para su uso como medicamento. En realizaciones específicas, los conjugados de anticuerpos y fármacos o las composiciones farmacéuticas son para usar en el tratamiento del cáncer en un paciente que lo necesite.

También se proporciona en el presente documento el uso de los anticuerpos contra P-cadherina, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, o conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención como se analiza en el presente documento para tratar el cáncer en un paciente que lo necesite.

5 En algunas realizaciones, el cáncer expresa P-cadherina. En realizaciones adicionales, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma adrenocortical, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de mama, teratomas/tumores rhabdoides atípicos del sistema nervioso central, cáncer de colon, cáncer colorrectal, tumores embrionarios, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, sarcoma de Kaposi, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, incluido el cáncer microcítico de pulmón y el cáncer no microcítico de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de recto, rhabdomyosarcoma, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer escamoso de cuello, cáncer de estómago, cáncer de útero, cáncer de vagina y cáncer de vulva. En realizaciones específicas, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cánceres de vejiga, de mama, de colon, colorrectal, de endometrio, de esófago, gástrico, de cabeza y cuello, de pulmón y de ovario.

15 La presente solicitud también desvela ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos contra P-cadherina o fragmentos de unión a antígeno de la invención como se desvela en el presente documento. En realizaciones específicas, los ácidos nucleicos comprenden la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 8, 18, 10 o 20. En una realización adicional, la presente invención proporciona vectores que comprenden los ácidos nucleicos de la invención como se desvelan en el presente documento, así como células hospedadoras que comprenden dichos vectores o ácidos nucleicos. La presente invención también proporciona procesos para producir un anticuerpo contra P-cadherina o un fragmento de unión a antígeno que comprenden cultivar la célula hospedadora de la invención y recuperar el anticuerpo del cultivo.

En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona un proceso para producir un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-P-cadherina que comprende:

- 25 (a) unir químicamente SMCC a una porción farmacológica DM-1;
- (b) conjugar dicho fármaco-conector con el anticuerpo recuperado del cultivo celular de la invención; y
- 30 (c) purificar el conjugado de anticuerpo y fármaco.

En otra realización, el proceso para producir un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-P-cadherina comprende:

- 35 (a) unir químicamente SMCC a una porción farmacológica DM-1;
- (b) conjugar dicho fármaco-conector con un anticuerpo de la invención como se desvela en el presente documento; y
- (c) purificar el conjugado de anticuerpo y fármaco.

40 En algunas realizaciones, los conjugados de anticuerpos y fármacos elaborados según estos procesos tienen una RFA promedio, medida con un espectrofotómetro UV, de aproximadamente 3,8.

En otras realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención como se desvela en el presente documento se usan como reactivos de diagnóstico. En algunas realizaciones de los reactivos de diagnóstico, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado con un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de captura de imágenes o un ion metálico.

Breve descripción de los dibujos

50 La figura 1 representa la vista general de la estructura cristalina de la P-cadherina humana EC1_EC2, que muestra los dos primeros dominios de repetición de cadherina del dominio extracelular de la P-cadherina humana, con los tres sitios de unión a calcio ubicados en la unión dominio-dominio.

La figura 2 representa la vista general de la estructura cristalina de dos Fab de anticuerpos contra P-cadherina en complejo con dos proteínas de P-cadherina humanas, que forman la unidad asimétrica del cristal. El recuadro es una vista en primer plano de la región de contacto en la que participa el dominio EC1 de las dos moléculas de P-cadherina. Solo existen unos pocos contactos cristalinos entre los dos complejos.

60 La figura 3 es un gráfico que representa restos de epítopos de P-cadherina humana (SEQ ID NO: 133) que entran en contacto con restos del Fab del anticuerpo NOV169N31Q contra P-cadherina. La secuencia de aminoácidos del dominio EC1 de P-cadherina humana se enumera en el eje horizontal. La parte superior del gráfico muestra el número de contactos intermoleculares directos entre el antígeno proteico y el anticuerpo, identificado por el programa NCONT utilizando una distancia de corte de 4,0 Å entre átomos distintos del hidrógeno. La parte inferior del gráfico muestra la reducción de la superficie accesible al disolvente (en Å²) en la que incurren los restos de P-cadherina tras la unión del anticuerpo,

calculada por el programa AREAIMOL. La estructura de barril β del dominio EC1 se muestra esquemáticamente como una cadena de flechas con etiquetas correspondientes a la numeración de las cadenas β .

La figura 4 representa una vista en primer plano de la estructura cristalina del dominio de repetición de cadherina N-terminal (EC1) de la cadherina P humana (dibujo gris) con todos los restos de aminoácidos que interactúan con el anticuerpo (distancia de corte de 4,0 Å) representados por barras negras (vista de anticuerpos).

La figura 5 representa una alineación de secuencias de los dominios EC1 de P-cadherina humano (SEQ ID NO: 133) y de macaco cangrejero ("cyno"; *Macaca fascicularis*) (SEQ ID NO: 134). Los restos de aminoácidos negros en negrita participan en contactos intermoleculares directos (<4,0 Å) con el anticuerpo NOV169N31Q. Los restos de aminoácidos grises en negrita e indicados con flechas están más lejos, pero experimentan una reducción de su superficie accesible al disolvente tras la unión del anticuerpo. Obsérvese que ambas categorías de restos epitópicos están completamente conservadas en la P-cadherina del macaco cangrejero.

La figura 6 representa una alineación de múltiples secuencias del dominio EC1 de cadherinas humanas (SEQ ID NO: 135-143, respectivamente, en orden de aparición). Obsérvese que la P-cadherina también se denomina "cadherina-3". Los restos en recuadros se encuentran en la interfaz antígeno-anticuerpo según lo determinado por una reducción de su superficie accesible al disolvente. En un recuadro con líneas gruesas se encuentra la inserción hallada en las cadherinas humanas 1 a 4. Obsérvese que el resto epitópico clave Glu155 no está conservado en otras cadherinas humanas.

La figura 7 representa microfotografías que ilustran el efecto del anticuerpo NOV169N31Q contra la P-cadherina sobre la adhesión celular mediada por P-cadherina. Las células se trataron previamente con NOV169N31Q o un anticuerpo IgG1 humano inespecífico antes de la inducción de la formación de esferoides. Las formas y densidades de los esferoides se evaluaron mediante microscopía después de un periodo de incubación de 132 horas.

La figura 8 representa gráficos que ilustran la potencia citotóxica *in vitro* de NOV169N31Q-MCC-DM1 en estirpes celulares positivas (HCC70 y HCC1954) y negativas (HT29) para P-cadherina. Dosis-respuesta *in vitro* de NOV169N31Q-MCC-DM1 en células (A) HCC1954 (P-cadherina+), (B) HCC70 (P-cadherina+) y (C) HT29 (P-cadherina-). La viabilidad se midió después de 5 días de tratamiento con maitansina libre (L-DM1-Me; círculo relleno), CAF de control de isotipo (IgG1-MCC-DM1; cuadrado vacío), componente de anticuerpo de NOV169N31Q-MCC-DM1 (NOV169N31Q; triángulo vacío) y NOV169N31Q-MCC-DM1 (triángulo relleno).

La figura 9 representa gráficos que ilustran la actividad ADCC de NOV169N31Q y NOV169N31Q-MCC-DM1. Las células diana se incubaron con un número fijo de células efectoras NK humanas nuevas (cociente de células efectoras frente a diana de 5:1) y cantidades crecientes de NOV169N31Q (círculos rellenos), anticuerpo de control IgG1 (círculos vacíos), NOV169N31Q-MCC-DM1 (cuadrados rellenos) o IgG1-SMCC-DM1 (cuadrados vacíos). Todas las muestras se realizaron por triplicado; la viabilidad celular se evaluó después de 24 horas.

La figura 10 representa una serie de imágenes de IHC para ilustrar la actividad del CAF NOV169N31Q-MCC-DM1 en el modelo de xenoinjerto de tumor subcutáneo de cáncer de mama triple negativo HCC70. Las imágenes ilustran la detención mitótica (p-histona H3) después de una dosis única de NOV169N31Q-MC-DM1.

La figura 11A representa una imagen representativa de IHC para P-cadherina en tejido tumoral HCC70 para mostrar la expresión de P-cadherina.

La figura 11B representa un gráfico que ilustra la eficacia de diversos CAF de P-cadherina en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama HCC70.

La figura 12 representa un gráfico que ilustra la eficacia de NOV169N31Q-MCC-DM1 contra un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama HCC70.

La figura 13A representa una imagen representativa de IHC para P-cadherina en tejido tumoral HCC1954 para mostrar la expresión de P-cadherina.

La figura 13B es un gráfico que ilustra la eficacia de NOV169N31Q-MCC-DM1 en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama HCC1954.

La figura 13C es un gráfico que ilustra la eficacia de NOV169N31Q-MCC-DM1 en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama HCC1954.

La figura 13D es un gráfico que representa el cambio del peso corporal de ratones con xenoinjerto de cáncer de mama HCC1954 en respuesta al tratamiento usando NOV169N31Q-MCC-DM1.

La figura 14A representa una imagen representativa de IHC para P-cadherina en tejido tumoral BICR6 para mostrar la expresión de P-cadherina.

La figura 14B representa un gráfico que ilustra la eficacia de NOV169N31Q-MCC-DM1 en un modelo de xenoinjerto de cáncer de cabeza y cuello BICR6.

5 La figura 15A representa una imagen representativa de IHC para P-cadherina en tejido tumoral scaBER para mostrar la expresión de P-cadherina.

La figura 15B representa un gráfico que ilustra la eficacia de NOV169N31Q-MCC-DM1 en un modelo de xenoinjerto de cáncer de vejiga scaBER.

10 La figura 16 representa un gráfico que ilustra la eficacia de NOV169N31Q-MCC-DM1 en un modelo de xenoinjerto de cáncer de esófago ED2267.

15 La figura 17 representa un gráfico que compara la eficacia del anticuerpo anti-P-cadherina NEG0067 conjugado con DM1 usando dos conectores diferentes (MCC frente a CX1-1) en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama HCC70.

La figura 18 representa un gráfico que compara la eficacia de 3 CAF anti-P-cadherina derivados de hibridoma murino conjugados usando la carga útil con conector SPDB-DM4 en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama HCC70.

20 Descripción detallada de la invención

Definiciones

25 A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos y expresiones utilizados en el presente documento tienen los siguientes significados:

El término "alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo monovalente saturada, que tiene el número especificado de átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C₁₋₆ se refiere a un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden ser lineales o ramificados. Los grupos alquilo ramificados representativos tienen una, dos o tres ramificaciones. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo (n-propilo e isopropilo), butilo (n-butilo, isobutilo, sec-butilo y t-butilo), pentilo (n-pentilo, isopentilo y neopentilo) y hexilo.

El término "anticuerpo", como se utiliza en el presente documento se refiere a un polipéptido de la familia de las inmunoglobulinas que es capaz de unirse a un antígeno correspondiente de forma no covalente, reversible y de manera específica. Por ejemplo, un anticuerpo IgG presente en la naturaleza es un tetrámero que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada se compone de una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada se compone de tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada una de las cadenas ligeras se compone de una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera se compone de un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amínico al extremo carboxílico en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. 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 mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del hospedador, que incluyen diversas células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

El término "anticuerpo" incluye, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, p. ej., anticuerpos anti-Id contra anticuerpos de la invención). Los anticuerpos pueden ser de cualquier isotipo/clase (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) o subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

Los "dominios determinantes de la complementariedad" o "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR") se refieren indistintamente a las regiones hipervariables de VL y VH. Las CDR son los sitios de unión a la proteína diana de las cadenas de anticuerpos que albergan la especificidad para dicha proteína diana. Existen tres CDR (CDR1-3, numeradas de forma secuencial a partir del extremo N-terminal) en cada VL o VH humana, que constituyen aproximadamente un 15-20 % de los dominios variables. Las CDR son complementarias desde el punto de vista estructural respecto al epítipo de la proteína diana y, por lo tanto, son las responsables directas de la especificidad de unión. Los tramos restantes de VL o VH, que se denominan regiones marco, presentan menos variación en la secuencia de aminoácidos (Kuby, *Immunology*, 4.^a ed., capítulo 4. W.H. Freeman & Co., Nueva York, 2000).

Las posiciones de las CDR y las regiones marco se pueden determinar utilizando diversas definiciones muy conocidas en la técnica, p. ej., Kabat, Chothia, base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT) (en la página web imgt.org/) y AbM (véase, p. ej., Johnson *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 29:205-206 (2001); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987);

Chothia *et al.*, *Nature*, 342:877-883 (1989); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227:799-817 (1992); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 273:927-748 (1997)). Las definiciones de sitios de combinación de antígenos también se describen en los siguientes documentos: Ruiz *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221 (2000); y Lefranc, M.P., *Nucleic Acids Res.*, 29:207-209 (2001); MacCallum *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 262:732-745 (1996); y Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 86:9268-9272 (1989); Martin *et al.*, *Methods Enzymol.*, 203:121-153 (1991); y Rees *et al.*, en Sternberg M.J.E. (ed.), *Protein Structure Prediction*, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996).

Tanto la cadena ligera como la pesada se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se utilizan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de las partes tanto de la cadena ligera (VL) como de la pesada (VH) determinan el reconocimiento y la especificidad del antígeno. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes tales como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor de Fc, unión al complemento y similares. Por convención, la numeración de los dominios de región constante aumenta a medida que pasan a ser más distales del sitio de unión a antígeno o extremo amino del anticuerpo. El extremo N es una región variable y en el extremo C hay una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden en realidad los dominios carboxiterminales de la cadena pesada y ligera, respectivamente.

La expresión "fragmento de unión a antígeno", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una o más partes de un anticuerpo que retienen la capacidad para interactuar de forma específica con (p. ej., mediante unión, impedimento estérico, estabilización/desestabilización, distribución espacial) un epítipo de un antígeno. Los ejemplos de fragmentos de unión incluyen, pero sin limitación, Fv monocatenarios (scFv), anticuerpos de camélidos, Fv conectados mediante disulfuro (sdFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)2, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546, 1989), que consiste en un dominio VH; y una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada, u otros fragmentos de unión a epítipo de un anticuerpo.

Asimismo, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, estén codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, a través de un conector sintético que permite que se preparen como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario ("scFv"); véase, p. ej., Bird *et al.*, *Science* 242:423-426, 1988; y Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883, 1988). También se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios estén englobados en la expresión "fragmento de unión a antígeno". Estos fragmentos de unión a antígeno se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la técnica y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma manera que para los anticuerpos intactos.

Los fragmentos de unión a antígeno también se pueden incorporar en anticuerpos de dominio único, maxicuerpos, minicuerpos, anticuerpos de dominio único, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005). Se pueden injertar fragmentos de unión a antígeno en armazones basados en polipéptidos tales como fibronectina de tipo III (Fn3) (véase la pat. de EE. UU. n.º 6.703.199, que describe monocuerpos contra polipéptidos de fibronectina).

Se pueden incorporar fragmentos de unión a antígeno en moléculas monocatenarias que comprenden un par de segmentos Fv en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8:1057-1062, 1995; y la pat. de los EE. UU. n.º 5.641.870).

La expresión "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales", como se utiliza en el presente documento, se refiere a polipéptidos, incluidos anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno que tienen una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica o proceden de la misma fuente genética. Esta expresión también incluye preparaciones de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular.

La expresión "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las CDR proceden de secuencias de origen humano. Asimismo, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también procede de dichas secuencias humanas, p. ej., secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana o un anticuerpo que contiene secuencias marco consenso procedentes del análisis de secuencias marco humanas, por ejemplo, como se describe en Knappik, *et al. J. Mol. Biol.* 296:57-86, 2000). También se incluyen anticuerpos procedentes de secuencias humanas en donde una o más CDR se han mutado para maduración de la afinidad o para fines de fabricación/conjugación de carga útil. Véase *Hvbridoma*. Agosto de 1997;16(4):381-9. Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies using RIMMS. Kilpatrick KE, Wring SA, Walker DH, Macklin MD, Payne JA, Su JL, Champion BR, Caterson B, McIntyre GD. Departamento de Ciencias Moleculares, Glaxo Wellcome, Research Triangle Park, NC 27709, EE. UU.

Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias humanas (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*, o una sustitución conservadora para fomentar la estabilidad o la fabricación).

5 El término "reconocer" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se encuentra e interactúa (p. ej., se une) con su epítopo, ya sea este lineal o conformacional. El término "epítopo" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención. Los epítopos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no
10 contiguos yuxtapuestos mediante plegamiento terciario de una proteína. Los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos normalmente se conservan al exponerse a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden al tratar con disolventes desnaturalizantes. Un epítopo incluye habitualmente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de epítopos incluyen técnicas de este campo, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional (véase, p. ej., *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).
15

El término "afinidad", como se usa en el presente documento, se refiere a la fuerza de interacción entre el anticuerpo y el antígeno en sitios antigénicos individuales. Dentro de cada sitio antigénico, la región variable del "brazo" del anticuerpo interactúa a través de fuerzas no covalentes débiles con el antígeno en numerosos sitios; cuantas más interacciones, más
20 fuerte es la afinidad.

La expresión "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un antígeno puede, sin embargo, tener reactividad cruzada respecto a otros antígenos. Además, un anticuerpo aislado puede estar
25 sustancialmente exento de otro material celular y/o sustancias químicas.

La expresión "secuencia de la línea germinal humana correspondiente" se refiere a la secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de la región variable humana que comparte la identidad de
30 secuencia de aminoácidos determinada más elevada con una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de la región variable de referencia en comparación con todas las demás secuencias de aminoácidos de la región variable conocidas codificadas por secuencias de la región variable de inmunoglobulina de la línea germinal humana. La secuencia de la línea germinal humana correspondiente también se puede referir a la secuencia o subsecuencia de aminoácidos de la región variable humana con la identidad de secuencia de aminoácidos más elevada con una secuencia o subsecuencia de aminoácidos de la región variable de referencia en comparación con todas las demás secuencias de aminoácidos de
35 la región variable evaluadas. La secuencia de la línea germinal humana correspondiente puede constar de regiones de marco únicamente, regiones determinantes de la complementariedad únicamente, regiones determinantes de la complementariedad y de marco, un segmento variable (según se ha definido anteriormente) u otras combinaciones de secuencias o subsecuencias que comprendan una región variable. La identidad de secuencia se puede determinar utilizando los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, alineando dos secuencias mediante BLAST, ALIGN u otro algoritmo de alineación conocido en la técnica. La secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico de la línea
40 germinal humana correspondiente puede tener al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico de la región variable de referencia. Las secuencias de la línea germinal humana correspondientes se pueden determinar, por ejemplo, mediante la base de datos internacional de dominio público ImMunoGeneTics (IMGT) (en la página web imgt.org/) y V-base (en la página web vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk).
45

La expresión "se une específicamente" o "se une selectivamente", cuando se utiliza en el contexto de describir la interacción entre un antígeno (p. ej., una proteína) y un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o agente de unión derivado del anticuerpo, se refiere a una reacción de unión que determina la presencia del antígeno en una población heterogénea
50 de proteínas y otros agentes biológicos, p. ej., en una muestra biológica, p. ej., una muestra de sangre, suero, plasma o tejido. De este modo, en determinadas condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos o agentes de unión con una especificidad de unión particular se unen a un antígeno particular en una cantidad que es al menos dos veces la de referencia y no se unen sustancialmente en ninguna cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. En una realización, en las condiciones de inmunoensayo designadas, el anticuerpo o agente de unión con una
55 especificidad de unión particular se une a un antígeno particular en una cantidad que es al menos diez (10) veces la de referencia y no se une sustancialmente en ninguna cantidad significativa a otros antígenos presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo o agente de unión en tales condiciones puede requerir que el anticuerpo o agente hayan sido seleccionados por su especificidad por una proteína particular. Según corresponda o se desee, esta selección se puede conseguir sustrayendo anticuerpos que reaccionen de forma cruzada con moléculas de otras especies (p. ej., de ratón o rata) u otros subtipos. Como alternativa, en algunas realizaciones, se seleccionan anticuerpos o fragmentos de
60 anticuerpo que reaccionan de forma cruzada con determinadas moléculas deseadas.

Se pueden utilizar diversos formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se utilizan inmunoensayos ELISA en fase sólida de forma rutinaria para
65 seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, p. ej., Harlow & Lane, *Using*

Antibodies, A Laboratory Manual (1998), para consultar una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayo que se pueden utilizar para determinar una inmunorreactividad específica). Habitualmente, una reacción de unión específica o selectiva producirá una señal de al menos el doble por encima de la señal de referencia y, más habitualmente, al menos de 10 a 100 veces por encima de la referencia.

La expresión "constante de disociación en equilibrio (KD, M)" se refiere a la constante de velocidad de disociación (kd, tiempo-1) dividida por la constante de velocidad de asociación (ka, tiempo-1, M-1). Las constantes de disociación en equilibrio se pueden medir utilizando cualquier método conocido en la técnica. Los anticuerpos de la presente invención tendrán generalmente una constante de disociación en equilibrio inferior a aproximadamente 10^{-7} o 10^{-8} M, por ejemplo, inferior a aproximadamente 10^{-9} M o 10^{-10} M, en algunas realizaciones, inferior a aproximadamente 10^{-11} M, 10^{-12} M o 10^{-13} M.

El término "biodisponibilidad" se refiere a la disponibilidad sistémica (es decir, niveles en sangre/plasma) de una cantidad determinada de fármaco administrado a un paciente. La biodisponibilidad es un término absoluto que indica la medición tanto del tiempo (velocidad) como de la cantidad total (alcance) de fármaco que llega a la circulación general desde una forma farmacéutica administrada.

La expresión "que consiste esencialmente en", como se utiliza en el presente documento, se refiere a los géneros o especies de agentes farmacéuticos activos incluidos en un método o composición, así como también a cualquier excipiente inactivo para el fin deseado de los métodos o composiciones. En algunas realizaciones, la expresión "que consiste esencialmente en" excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes activos adicionales que no sean un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención. En algunas realizaciones, la expresión "que consiste esencialmente en" excluye expresamente la inclusión de uno o más agentes activos adicionales que no sean un conjugado de anticuerpo y fármaco de la invención y un segundo agente coadministrado.

El término "aminoácido" se refiere a los aminoácidos naturales, sintéticos y artificiales, así como a los análogos de aminoácidos y a los miméticos de aminoácidos que funcionan de forma similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, p. ej., hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, p. ej., homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina o metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (p. ej., norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una manera similar a un aminoácido natural.

La expresión "variante modificada de forma conservadora" se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como a las de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, variantes modificadas de forma conservadora se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de forma conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina y TGG, que normalmente es el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada una de las variaciones silenciosas de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada una de las secuencias descritas.

Para las secuencias polipeptídicas, las "variantes modificadas de forma conservadora" incluyen sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia polipeptídica que dan lugar a la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Tales variantes modificadas de forma conservadora son adicionales y no excluyen variantes polimórficas, homólogos entre especies y alelos de la invención. Los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, p. ej., Creighton, *Proteins* (1984)). En algunas realizaciones, la expresión "modificaciones de secuencia conservadoras" se usa para referirse a modificaciones de aminoácidos que no afectan ni alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos.

El término "optimizado", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de nucleótidos que ha sido alterada para codificar una secuencia de aminoácidos utilizando codones que se prefieren en la célula u organismo de

producción, generalmente una célula eucariota, por ejemplo, una célula de levadura, una célula de *Pichia*, una célula de *Trichoderma*, una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula humana. La secuencia de nucleótidos optimizada se genomanipula para que conserve por completo o en la mayor medida posible la secuencia de aminoácidos originalmente codificada por la secuencia de nucleótidos de partida, que también se conoce como la secuencia "parental".

Las expresiones "porcentaje idéntico" o "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipeptídicas, se refieren a la medida en que dos o más secuencias o subsecuencias son iguales. Dos secuencias son "idénticas" si tienen la misma secuencia de aminoácidos o nucleótidos en la región que se compara. Dos secuencias son "sustancialmente idénticas" si dos secuencias tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, un 60 % de identidad, opcionalmente un 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad en una región especificada o, cuando no se especifica, en toda la secuencia), cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima en una ventana de comparación o región designada como se mide utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Opcionalmente, la identidad existe sobre una región que tiene al menos aproximadamente 30 nucleótidos (o 10 aminoácidos) de longitud, o más preferiblemente sobre una región que tiene entre 100 y 500 o 1000 o más nucleótidos (o 20, 50, 200 o más aminoácidos) de longitud.

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Pueden usarse los parámetros por defecto del programa o pueden indicarse parámetros alternativos. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, tomando como base los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se utiliza en el presente documento, incluye referencia a un segmento de uno cualquiera del número de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en de 20 a 600, habitualmente de 50 a 200, más habitualmente de 100 a 150, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas de manera óptima. Se conocen bien en la técnica métodos de alineación de secuencias para comparación. La alineación óptima de secuencias para comparación puede realizarse, p. ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482c (1970), mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante alineación manual e inspección visual (véase, p. ej., Brent *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, 2003).

Dos ejemplos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 25: 3389-3402, 1977; y Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215: 403-410, 1990, respectivamente. El programa informático para realizar el análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos. Este algoritmo implica identificar, en primer lugar, las parejas de secuencias con alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. Se hace referencia a T como el umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul *et al.*, citado anteriormente). Estos aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que las contengan. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada una de las secuencias hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineamiento acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos no coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulada disminuye en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 90:5873-5787, 1993). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación

del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es de menos de aproximadamente 0,2, más preferiblemente de menos de aproximadamente 0,01 y mucho más preferiblemente de menos de aproximadamente 0,001.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos también puede determinarse mediante el algoritmo de E. Meyers y W. Miller, *Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17,, 1988) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de pesos de restos PAM120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453, 1970) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de programas informáticos GCG (disponible en www.gcg.com), utilizando una matriz Blossom 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Aparte del porcentaje de identidad de secuencia indicado anteriormente, otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticos es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico tiene una reacción inmunológicamente cruzada con los anticuerpos producidos contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación. Por lo tanto, un polipéptido normalmente es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos polipéptidos difieren solamente por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos hibriden entre sí en condiciones rigurosas, como se describe a continuación. Otra indicación más de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que puedan usarse los mismos cebadores para amplificar la secuencia.

La expresión "ácido nucleico" se usa en el presente documento indistintamente con el término "polinucleótido" y se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. La expresión engloba ácidos nucleicos que contienen análogos nucleotídicos conocidos o restos de la cadena principal o enlaces modificados, que son sintéticos, naturales y no naturales, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos peptidonucleicos (APN).

A menos que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca de forma implícita variantes modificadas de forma conservadora de la misma (p. ej., sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada explícitamente. Específicamente, como se detalla a continuación, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con restos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzer *et al.*, (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka *et al.*, (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; y Rossolini *et al.*, (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98).

La expresión "unido operativamente", en el contexto de los ácidos nucleicos, se refiere a una relación funcional entre dos o más segmentos de polinucleótidos (p. ej., ADN). Normalmente, se refiere a la relación funcional de una secuencia reguladora de la transcripción con una secuencia transcrita. Por ejemplo, una secuencia promotora o potenciadora está unida operativamente a una secuencia codificante si estimula o modula la transcripción de la secuencia codificante en una célula hospedadora apropiada u otro sistema de expresión. Generalmente, las secuencias reguladoras de la transcripción promotoras que están unidas operativamente a una secuencia transcrita están físicamente contiguas a la secuencia transcrita, es decir, son de acción en *cis*. Sin embargo, algunas secuencias reguladoras de la transcripción, tales como potenciadores, no necesitan estar físicamente contiguas o ubicadas muy próximas a las secuencias codificantes cuya transcripción potencian.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia polipeptídica particular también abarca de manera implícita variantes modificadas de forma conservadora de la misma.

La expresión "conjugado de anticuerpo y fármaco" o "inmunoconjugado" como se usa en el presente documento se refiere a la unión de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo con otro agente, tal como un agente quimioterapéutico, una toxina, un agente inmunoterapéutico, una sonda de captura de imágenes y similares. La unión puede ser por enlaces covalentes o interacciones no covalentes, tales como mediante fuerzas electrostáticas. Se pueden emplear diversos conectores, conocidos en la técnica, para formar el conjugado de anticuerpo y fármaco. Adicionalmente, el conjugado de anticuerpo y fármaco puede proporcionarse en forma de una proteína de fusión que puede expresarse a partir de un polinucleótido que codifica el inmunoconjugado. Como se usa en el presente documento, "proteína de fusión" se refiere a proteínas creadas mediante la unión de dos o más genes o fragmentos de genes que originalmente codificaban proteínas separadas (incluidos péptidos y polipéptidos). La traducción del gen de fusión da lugar a una única proteína con propiedades funcionales procedentes de cada una de las proteínas originales.

El término "sujeto" incluye seres humanos y animales no humanos. Los animales no humanos incluyen todos los vertebrados, p. ej., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios y reptiles. Excepto cuando se indique otra cosa, los términos "paciente" o "sujeto" se usan en el presente documento indistintamente.

5 La expresión "citotoxina" o "agente citotóxico", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier agente que sea perjudicial para el crecimiento y la proliferación de las células y puede actuar para reducir, inhibir o destruir una célula o neoplasia maligna.

10 La expresión "agente antineoplásico", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier agente que se pueda utilizar para tratar un trastorno proliferativo celular, tal como el cáncer, incluidos, pero sin limitación, agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, radioterapia y agentes radioterapéuticos, agentes antineoplásicos dirigidos y agentes inmunoterapéuticos.

15 La expresión "porción farmacológica" o "carga útil" como se usa en el presente documento se refiere a una porción química que está conjugada con un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención y puede incluir cualquier agente terapéutico o de diagnóstico, por ejemplo, un agente antineoplásico, antiinflamatorio, antiinfeccioso (p. ej., antifúngico, antibacteriano, antiparasitario, antivírico) o anestésico. Por ejemplo, la porción farmacológica puede ser un agente antineoplásico, tal como una citotoxina. En determinadas realizaciones, se selecciona una porción farmacológica entre un
20 inhibidor de V-ATPasa, un inhibidor de HSP90, un inhibidor de IAP, un inhibidor de mTor, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, una dolastatina, un maitansinoide, una MetAP (metionina aminopeptidasa), un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, un inhibidor de reacciones de transferencia de fosforilo en las mitocondrias, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de cinasas, un inhibidor de CDK2, un inhibidor de CDK9, un inhibidor del proteasoma, un inhibidor de cinesinas, un inhibidor de HDAC, un agente que daña el ADN, un agente alquilante del ADN, un intercalante de ADN, un agente de unión al surco menor del ADN y un inhibidor de DHFR. Se conocen en la técnica métodos para unir cada uno de estos a un conector compatible con los anticuerpos y un método de la invención. Véase, p. ej., Singh *et al.*, (2009) *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, vol. 525, 445-457. Además, una carga útil puede ser una sonda biofísica, un fluoróforo, un
25 marcador de espín, una sonda infrarroja, una sonda de afinidad, un quelante, una sonda espectroscópica, una sonda radioactiva, una molécula lipídica, un polietilenglicol, un polímero, un espín. etiqueta, ADN, ARN, una proteína, un péptido, una superficie, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una nanopartícula, un punto cuántico, un liposoma, una partícula de PLGA, un sacárido o un polisacárido.

La expresión "porción farmacológica maitansinoide" se refiere a la subestructura de un conjugado de anticuerpo y fármaco que tiene la estructura de un compuesto maitansinoide. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente de los EE. UU. n.º 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de los EE. UU. n.º 4.151.042). Se han descrito maitansinol sintético y análogos de maitansinol. Véanse las patentes de los EE. UU. n.º 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533 y Kawai *et al.* (1984) *Chem. Pharm. Bull.* 3441-3451). Los ejemplos de maitansinoides específicos útiles para la conjugación incluyen DM1, DM3 y DM4.

45 El término "tumor" se refiere a la proliferación y el crecimiento celular neoplásico, ya sea maligno o benigno, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

La expresión "actividad antitumoral" se refiere a una reducción en la tasa de proliferación, viabilidad o actividad metastásica de células tumorales. Por ejemplo, la actividad antitumoral puede mostrarse por una disminución de la tasa de crecimiento de células anómalas que surge durante la terapia o la estabilidad o reducción del tamaño del tumor, o una supervivencia más larga debido a la terapia en comparación con el control sin terapia. Dicha actividad se puede evaluar utilizando modelos tumorales *in vitro* o *in vivo* aceptados, que incluyen, pero sin limitación, modelos de xenoinjerto, modelos de aloinjerto, modelos de MMTV y otros modelos conocidos en la técnica para investigar la actividad antitumoral.

55 La expresión "neoplasia maligna" se refiere a un tumor no benigno o un cáncer. Como se usa en el presente documento, el término "cáncer" incluye una neoplasia maligna caracterizada por un crecimiento celular desregulado o descontrolado. Los tipos de cáncer ilustrativos incluyen: carcinomas, sarcomas, leucemias y linfomas.

60 El término "cáncer" incluye tumores malignos primarios (p. ej., aquellos cuyas células no han migrado a sitios en el cuerpo del sujeto distintos del sitio del tumor original) y tumores malignos secundarios (p. ej., los que surgen de la metástasis, la migración de células tumorales a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original).

El término "P-cadherina" (que también se conoce como Pcad, PCad o CDH3) se refiere al ácido nucleico y la secuencia de aminoácidos de la P-cadherina, que se han publicado en los números de referencia de GenBank NP_001784, NP_001784.2 (secuencia de aminoácidos) y NM_001793.4, números de referencia de GenBank AA14462, NG_009096 y

NG_009096.1 (secuencias de nucleótidos). La información de secuencia de los dominios 1-5 de P-cadherina humana es extracelular y está publicada en los números de referencia de GenBank NM_001793.4 y NP_001784.

"P-cadherina" también se refiere a proteínas y secuencias de aminoácidos que en toda su longitud tienen al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de los números de referencia de GenBank anteriores NP_001784, NP_001784.2.

Estructuralmente, una secuencia de ácido nucleico de P-cadherina presenta sobre su dominio extracelular al menos aproximadamente un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico del número de referencia de GenBank NM_001793.4, números de referencia de GenBank AA14462, NG_009096 y NG_009096.1.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "tratar", "que trata" o "tratamiento" de cualquier enfermedad o trastorno se refiere, en una realización, a aliviar la enfermedad o el trastorno (es decir, ralentizar o detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o al menos uno de los síntomas clínicos de esta). En otra realización, "tratar", "que trata" o "tratamiento" se refiere a aliviar o mejorar al menos un parámetro físico que incluye los que pueden no ser discernibles por el paciente. En otra realización más, "tratar", "que trata" o "tratamiento" se refiere a modular la enfermedad o trastorno, ya sea físicamente (p. ej., estabilización de un síntoma perceptible), fisiológicamente (p. ej., estabilización de un parámetro físico), o ambos. En otra realización más, "tratar", "que trata" o "tratamiento" se refiere a prevenir o retrasar la aparición o el desarrollo o avance de la enfermedad o trastorno.

La expresión "cantidad terapéuticamente aceptable" o "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere indistintamente a una cantidad suficiente para lograr el resultado deseado (es decir, una reducción del tamaño del tumor, inhibición del crecimiento del tumor, prevención de metástasis, inhibición o prevención de infecciones víricas, bacterianas, fúngicas o parasitarias). En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente aceptable no induce ni provoca efectos secundarios no deseados. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente aceptable induce o causa efectos secundarios, pero solo los que son aceptables por los profesionales sanitarios en vista del estado del paciente. Una cantidad terapéuticamente aceptable se puede determinar administrando en primer lugar una dosis baja y a continuación incrementando de forma gradual esa dosis hasta que se consiga el efecto deseado. Una "dosis profilácticamente eficaz" y una "dosis terapéuticamente eficaz" de las moléculas de la invención puede prevenir el inicio o dar lugar a una reducción de la gravedad de, respectivamente, los síntomas patológicos, incluidos síntomas asociados con el cáncer.

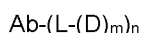
El término "coadministrar" se refiere a la presencia de dos agentes activos en la sangre de un individuo. Los agentes activos que se coadministran se pueden suministrar de forma simultánea o secuencial.

La presente invención proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) y conjugados de los mismos con fármacos, es decir, conjugados de anticuerpos y fármacos o CAF, que se unen a P-cadherina. En particular, la presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen a P-cadherina y se internalizan tras dicha unión. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) de la presente invención se pueden utilizar para producir conjugados de anticuerpos y fármacos. Además, la presente invención proporciona conjugados de anticuerpos y fármacos que tienen características farmacocinéticas deseables y otros atributos deseables y, por lo tanto, pueden usarse para tratar el cáncer que expresa P-cadherina. La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención y métodos para preparar y utilizar dichas composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer.

Conjugados de anticuerpos y fármacos

La presente invención proporciona conjugados de anticuerpos y fármacos también denominados inmunoconjugados, en los que un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o su equivalente funcional que se une específicamente a la P-cadherina está ligado a una porción farmacológica. En un aspecto, los anticuerpos, los fragmentos de unión a antígeno o sus equivalentes funcionales de la invención se ligan, mediante unión covalente a través de un conector, a una porción farmacológica que es un agente antineoplásico. Los conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención pueden administrar selectivamente una dosis eficaz de un agente antineoplásico (p. ej., un agente citotóxico) a tejidos tumorales que expresan P-cadherina, de modo que se puede lograr una mayor selectividad (y una dosis eficaz más baja).

En un aspecto, la invención proporciona un inmunoconjugado de Fórmula (I):



en donde Ab representa un anticuerpo de unión a P-cadherina como se define en las reivindicaciones;

L es un conector;

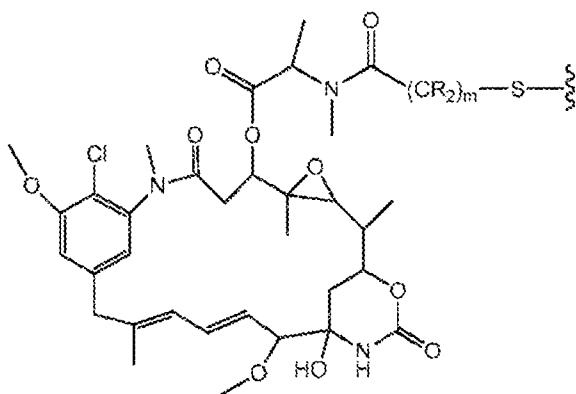
D es una porción farmacológica;

m es un número entero entre 1 y 8; y

n es un número entero entre 1 y 10. En algunas realizaciones, n es un número entero entre 2 y 8 o entre 2 y 5. En una realización específica, n es 2, 3 o 4. En algunas realizaciones, m es 1; en otras realizaciones, m es 2, 3 o 4.

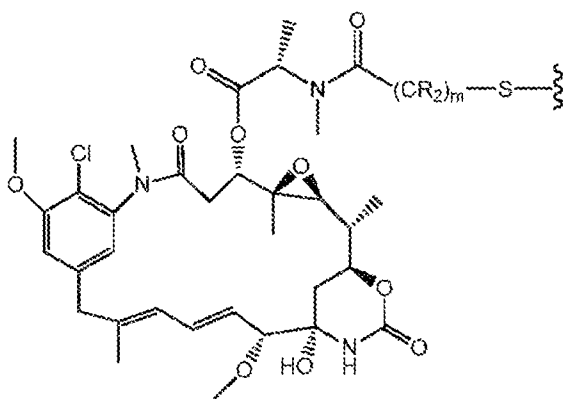
Si bien la relación fármaco/anticuerpo tiene un valor exacto para una molécula conjugada específica (p. ej., n multiplicado por m en Fórmula (I)), se entiende que el valor a menudo será un valor promedio cuando se usa para describir una muestra que contiene muchas moléculas, debido a cierto grado de falta de homogeneidad, normalmente asociado con la etapa de conjugación. La carga promedio para una muestra de un inmunoconjugado se denomina en el presente documento "relación fármaco/anticuerpo" o "RFA". En algunas realizaciones, cuando el fármaco es maitansinoide, se denomina "RMA". En algunas realizaciones, la RFA está entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6, y normalmente es aproximadamente 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0. En algunas realizaciones, al menos un 50 % de una muestra es un compuesto que tiene la RFA promedio más o menos 2 y preferiblemente al menos un 50 % de la muestra es un conjugado que contiene la RFA promedio más o menos 1. Las realizaciones incluyen inmunoconjugados en donde la RFA es aproximadamente 3,5, 3,6, 3,7, 3,8 o 3,9. En algunas realizaciones, una RFA de "aproximadamente n" significa que el valor medido para RFA está a un intervalo del 20 % de n.

La presente invención también está dirigida a inmunoconjugados que comprenden los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) y sus equivalentes funcionales como se definen en las reivindicaciones, ligados o conjugados con una porción farmacológica. En una realización, la porción farmacológica D es una porción farmacológica maitansinoide, incluidas las que tienen la estructura:

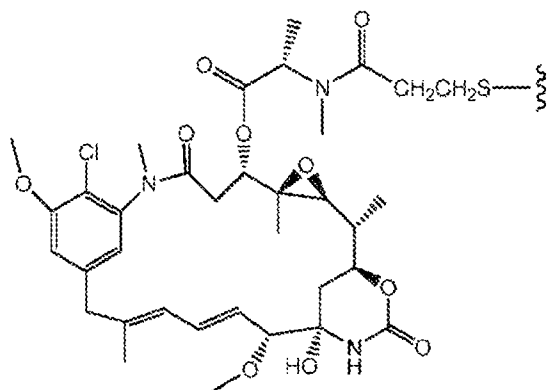


donde la línea ondulada indica la unión covalente del átomo de azufre del maitansinoide a un conector de un conjugado de anticuerpo y fármaco. R en cada caso es independientemente H o alquilo C₁-C₆. La cadena de alqueno que une el grupo amida al átomo de azufre puede ser metanilo, etanilo o propilo, es decir, m es 1, 2 o 3. (Patente de los EE. UU. n.º 633.410, patente de los EE. UU. n.º 5.208.020, Chari *et al.* (1992) Cancer Res. 52:127-131, Lui *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8618-8623).

Todos los estereoisómeros de la porción farmacológica maitansinoide se contemplan para los inmunoconjugados de la invención, es decir, cualquier combinación de configuraciones R y S en los carbonos quirales del maitansinoide. En una realización, la porción farmacológica maitansinoide tiene la siguiente estereoquímica.



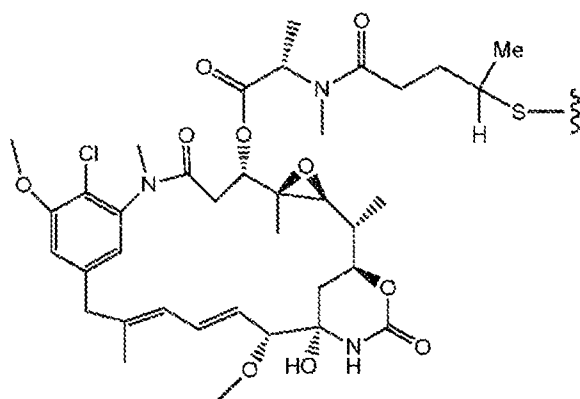
En una realización, la porción farmacológica maitansinoide es *N*^{2'}-desacetil-*N*^{2'}-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (que también se conoce como DM1). DM1 está representada por la siguiente fórmula estructural.



DM1

5

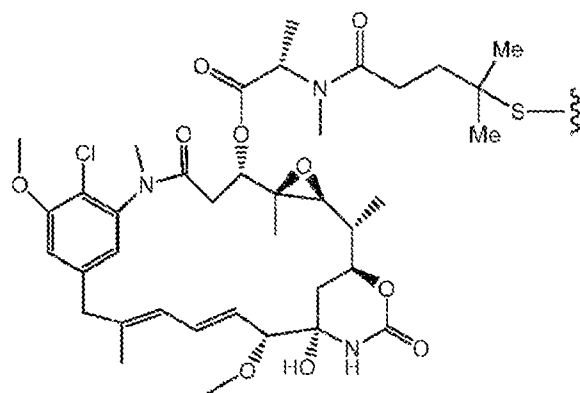
En otra realización, la porción farmacológica maitansinoide es *N*^{2'}-desacetil-*N*^{2'}-(4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (que también se conoce como DM3). DM3 está representada por la siguiente fórmula estructural.



DM3

10

En otra realización, la porción farmacológica maitansinoide es *N*^{2'}-desacetil-*N*^{2'}-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina (que también se conoce como DM4). DM4 está representada por la siguiente fórmula estructural.



DM4

15

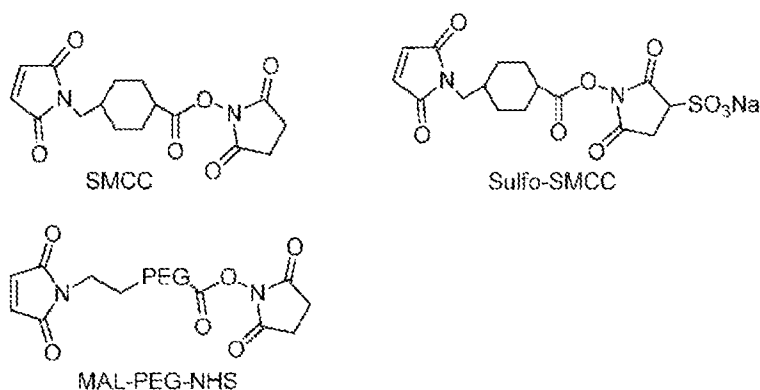
La porción farmacológica D puede unirse al anticuerpo Ab a través del conector L. L es cualquier resto químico capaz de unir la porción farmacológica al anticuerpo mediante enlaces covalentes. Un reactivo de reticulación es un reactivo

bifuncional o multifuncional que se puede usar para unir una porción farmacológica y un anticuerpo para formar conjugados de anticuerpos y fármacos. Los conjugados de anticuerpos y fármacos se pueden preparar usando un reactivo de reticulación que tenga una funcionalidad reactiva capaz de unirse tanto a la porción farmacológica como al anticuerpo. Por ejemplo, una cisteína, un tiol o una amina, p. ej., el extremo N o una cadena lateral de un aminoácido, tal como una lisina del anticuerpo, pueden formar un enlace con un grupo funcional de un reactivo de reticulación.

En una realización, L es un conector escindible. En otra realización, L es un conector no escindible. En algunas realizaciones, L es un conector lábil frente a ácidos, un conector fotolábil, un conector escindible con peptidasa, un conector escindible con esterasa, un conector escindible por enlaces disulfuro, un conector hidrófilo, un conector procargado o un conector a base de ácido dicarboxílico.

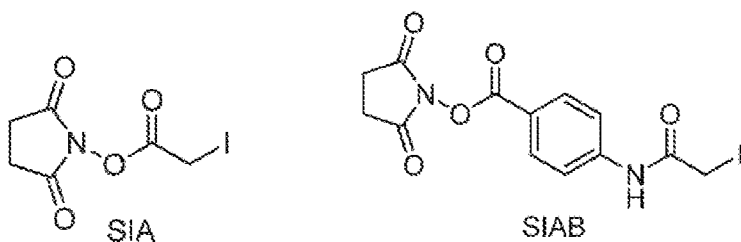
Los reactivos de reticulación adecuados que forman un conector no escindible entre la porción farmacológica, por ejemplo, maitansinoide, y el anticuerpo son bien conocidos en la técnica, y pueden formar enlaces no escindibles que comprenden un átomo de azufre (tal como SMCC) o los que no tienen átomo de azufre. Los reactivos de reticulación preferidos que forman enlaces no escindibles entre la porción farmacológica, por ejemplo, maitansinoide, y el anticuerpo comprenden una porción a base de maleimido o haloacetilo. Según la presente invención, se dice que dichos conectores no escindibles derivan de porciones a base de maleimido o haloacetilo.

Los reactivos de reticulación que comprenden un resto a base de maleimido incluyen, entre otros, *N*-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC), *N*-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato), que es un análogo de "cadena larga" de SMCC (LC-SMCC), *N*-éster succinimidílico de ácido κ -maleimidoundeconoico (KMUA), *N*-éster succinimidílico de ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), *N*-éster succinimidílico de ácido ϵ -maleimidocaproico (EMCS), éster de *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hidroxisuccinimida (MBS), éster de *N*-(maleimidoacetoxi)-succinimida (AMSA), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), *N*-succinimidil-4-(*p*-maleimidofenil)-butirato (SMPB), *N*-(*p*-maleimidofenil)isocianato (PMIP) y reactivos de reticulación a base de maleimido que contienen un espaciador de polietilenglicol, tales como MAL-PEG-NHS. Estos reactivos de reticulación forman enlaces no escindibles derivados de porciones a base de maleimido. A continuación se muestran estructuras representativas de reactivos de reticulación a base de maleimido.



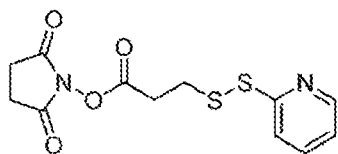
En otra realización, el conector L deriva de *N*-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), 4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) o MAL-PEG-NHS.

Los reactivos de reticulación que comprenden un resto a base de haloacetilo incluyen *N*-succinimidil yodoacetato (SIA), *N*-succinimidil (4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB), *N*-succinimidil bromoacetato (SBA) y *N*-succinimidil 3-(bromoacetamido)propionato (SBAP). Estos reactivos de reticulación forman conectores no escindibles derivados de porciones a base de maleimido. A continuación se muestran estructuras representativas de reactivos de reticulación a base de haloacetilo.

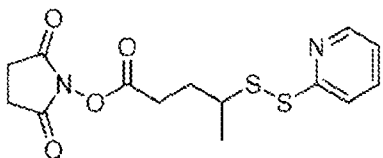


En una realización, el conector L deriva de N-succinimidil yodoacetato (SIA) o N-succinimidil (4-yodoacetil)aminobenzoato (SLAB).

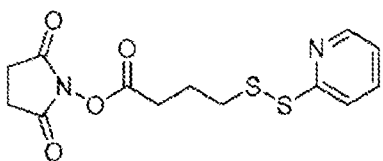
- 5 Los reactivos de reticulación adecuados que forman un conector escindible entre la porción farmacológica, por ejemplo, maitansinoide, y el anticuerpo son bien conocidos en la técnica. Los conectores que contienen disulfuro son conectores escindibles mediante intercambio de disulfuro, lo que puede suceder en condiciones fisiológicas. Según la presente invención, se dice que dichos conectores escindibles derivan de porciones a base de disulfuro. Los reactivos de
- 10 reticulación de disulfuro adecuados incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil-4-(2-piridilditio) butanoato (SPDB) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB), cuyas estructuras se muestran a continuación. Estos reactivos de reticulación forman un



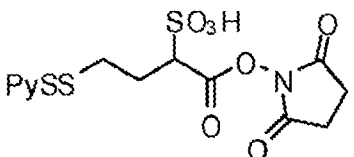
15 N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP),



20 N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP),



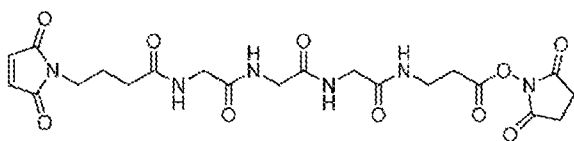
25 N-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB) y



N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB).

- 30 En una realización, el conector L deriva de N-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB).

Los reactivos de reticulación adecuados que forman un conector con carga entre la porción farmacológica, por ejemplo, maitansinoide, y el anticuerpo se conocen como reactivos de reticulación procargados. En una realización, el conector L deriva del reactivo de reticulación procargado CX1-1. La estructura de CX1-1 se encuentra a continuación.

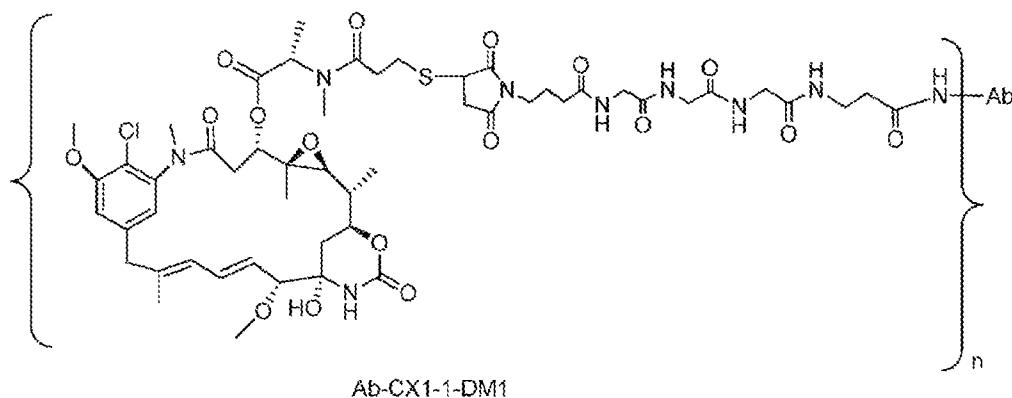
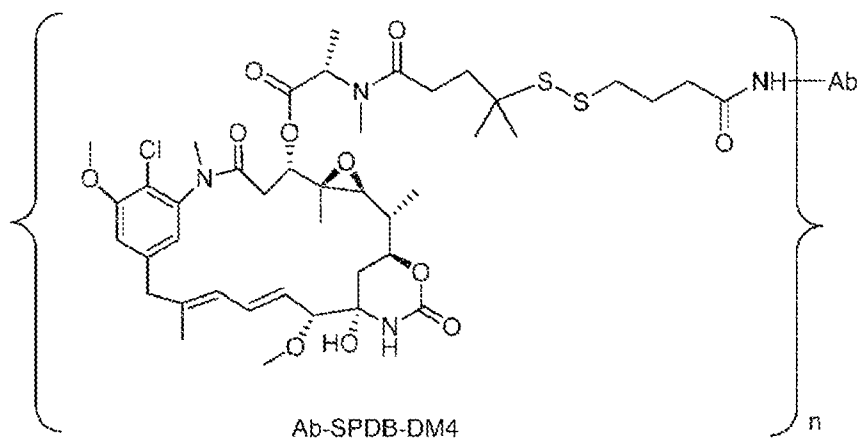
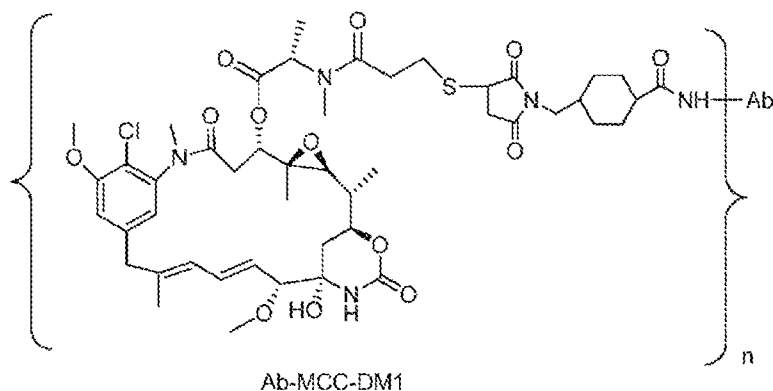


2,5-dioxopirrolidin-1-il 17-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetraazaheptadecan-1-oato (CX1-1)

Cada uno de los reactivos de reticulación representados anteriormente contiene, en un extremo del reactivo de reticulación, un NHS-éster que reacciona con una amina primaria del anticuerpo para formar un enlace amida y, en el otro extremo, un

grupo maleimida o grupo piridinildisulfuro que reacciona con el sulfhidrido de la porción farmacológica maitansinoide para formar un enlace tioéter o disulfuro.

En una realización, el conjugado de la presente invención está representado por una cualquiera de las siguientes fórmulas estructurales



en donde:

Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención que se une específicamente a P-cadherina;

n, que indica el número de grupos D-L unidos al Ab mediante la formación de un enlace amida con una amina primaria del Ab, es un número entero de 1 a 10. En una realización, n es un número entero entre 2 y 8 o entre 2 y 5. En una realización específica, n es 3 o 4.

En una realización, la relación molar promedio de fármaco (p. ej., DM1 o DM4) con respecto al anticuerpo en el conjugado (es decir, el valor n promedio, que también se conoce como relación de maitansinoide/anticuerpo (MAR)) es de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 (p. ej., 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1,

5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, o 8,1), de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 7, de aproximadamente 3 a aproximadamente 5, de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,5 (p. ej., aproximadamente 2,5, aproximadamente 2,6, aproximadamente 2,7, aproximadamente 2,8, aproximadamente 2,9, aproximadamente 3,0, aproximadamente 3,1, aproximadamente 3,3, aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,5, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,7, aproximadamente 3,8, aproximadamente 3,9, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,1, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,3, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,5), de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 4,0, de aproximadamente 3,2 a aproximadamente 4,2 o de aproximadamente 4,5 a 5,5 (p. ej., aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,7, aproximadamente 4,8, aproximadamente 4,9, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,1, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,3, aproximadamente 5,4 o aproximadamente 5,5).

En un aspecto de la invención, el conjugado de la presente invención tiene una pureza sustancialmente alta y tiene una o más de las siguientes características: (a) más de aproximadamente el 90 % (p. ej., más de o igual a aproximadamente el 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %), preferiblemente más de aproximadamente el 95 %, de especies conjugadas son monoméricas, (b) el nivel de conector sin conjugar en la preparación de conjugado es inferior a aproximadamente el 10 % (p. ej., inferior o igual a aproximadamente el 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o 0 %) (en relación con el conector total), (c) menos del 10 % de las especies conjugadas están reticuladas (p. ej., menos de o igual a aproximadamente el 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o 0 %), (d) el nivel de fármaco libre (p. ej., DM1 o DM4) en la preparación de conjugado es inferior a aproximadamente el 2 % (p. ej., inferior o igual a aproximadamente el 1,5 %, 1,4 %, 1,3 %, 1,2 %, 1,1 %, 1,0 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,5 %, 0,4 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 % o 0 %) (mol/mol en relación con el agente citotóxico total) y/o (e) no se produce ningún aumento sustancial del nivel de fármaco libre (p. ej., DM1 o DM4) durante el almacenamiento (p. ej., después de aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años o aproximadamente 5 años). "Aumento sustancial" del nivel de fármaco libre (p. ej., DM1 o DM4) significa que después de cierto tiempo de almacenamiento (p. ej., aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años o aproximadamente 5 años), el aumento del nivel de fármaco libre (p. ej., DM1 o DM4) es menos de aproximadamente 0,1 %, aproximadamente 0,2 %, aproximadamente 0,3 %, aproximadamente 0,4 %, aproximadamente 0,5 %, aproximadamente 0,6 %, aproximadamente 0,7 %, aproximadamente 0,8 %, aproximadamente 0,9 %, aproximadamente 1,0 %, aproximadamente 1,1 %, aproximadamente 1,2 %, aproximadamente 1,3 %, aproximadamente 1,4 %, aproximadamente 1,5 %, aproximadamente 1,6 %, aproximadamente 1,7 %, aproximadamente 1,8 %, aproximadamente 1,9 %, aproximadamente 2,0 %, aproximadamente 2,2 %, aproximadamente 2,5 %, aproximadamente 2,7 %, aproximadamente 3,0 %, aproximadamente 3,2 %, aproximadamente 3,5 %, aproximadamente 3,7 % o aproximadamente 4,0 %.

Como se usa en el presente documento, la expresión "conector sin conjugar" se refiere al anticuerpo que está unido covalentemente con un conector derivado de un reactivo de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1), en donde el anticuerpo no está acoplado covalentemente al fármaco (p. ej., DM1 o DM4) a través de un conector (es decir, el "conector sin conjugar" puede estar representado por Ab-MCC, Ab-SPDB o Ab-CX1-1).

1. Porción farmacológica

La presente invención proporciona inmunoconjugados que se unen específicamente a P-cadherina. Los conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención comprenden anticuerpos anti-P-cadherina, fragmentos de anticuerpo (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la invención que están conjugados con una porción farmacológica, p. ej., un agente antineoplásico, un agente de tratamiento autoinmunitario, un agente antiinflamatorio, un agente antifúngico, un agente antibacteriano, un agente antiparasitario, un agente antivírico o un agente anestésico. Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la invención se pueden conjugar con varias porciones farmacológicas idénticas o diferentes usando cualquier método conocido en la técnica.

En determinadas realizaciones, la porción farmacológica de los inmunoconjugados de la presente invención se selecciona de un grupo que consiste en un inhibidor de la V-ATPasa, un agente proapoptótico, un inhibidor de Bcl2, un inhibidor de MCL1, un inhibidor de HSP90, un inhibidor de IAP, un inhibidor de mTor, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, una dolastatina, una maitansinoide, una MetAP (metionina aminopeptidasa), un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, un inhibidor de Eg5, inhibidores de proteasomas, un inhibidor de reacciones de transferencia de fosforilo en las mitocondrias, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de cinasas, un inhibidor de CDK2, un inhibidor de CDK9, un inhibidor de cinesina, un inhibidor de HDAC, un agente que daña el ADN, un agente alquilante de ADN, un intercalante de ADN, un agente de unión al surco menor del ADN y un inhibidor de DHFR.

En una realización, la porción farmacológica de los inmunoconjugados de la presente invención es una porción farmacológica maitansinoide, tal como, pero sin limitación, DM1, DM3 o DM4.

Además, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente invención pueden conjugarse con una porción farmacológica que modifica una respuesta biológica determinada. Las porciones farmacológicas no deben interpretarse como limitadas a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción farmacológica puede ser una proteína, un péptido o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina colérica o toxina diftérica, una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador tisular del plasminógeno, una citocina, un agente apoptótico, un agente antiangiogénico, o un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfocina.

En una realización, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente invención se conjugan con una porción farmacológica, tal como una citotoxina, un fármaco (p. ej., un inmunosupresor) o una radiotoxina. Los ejemplos de citotoxinas incluyen, pero sin limitación, taxanos (véanse, p. ej., las solicitudes de patente internacional (PCT) n.º WO 01/38318 y WO 03/097625), agentes alquilantes de ADN (p. ej., análogos de CC-1065), antraciclinas, análogos de tubulisina, análogos de duocarmicina, auristatina E, auristatina F, maitansinoides y agentes citotóxicos que comprenden una porción reactiva de polietilenglicol (véase, p. ej., Sasse *et al.*, J. Antibiot. (Tokio), 53, 879-85 (2000), Suzawa *et al.*, Bioorg. Medicina. Chem., 8, 2175-84 (2000), Ichimura *et al.*, J. Antibiot. (Tokio), 44, 1045-53 (1991), Francisco *et al.*, Blood (2003) (publicación electrónica antes de la publicación impresa), patentes de los EE. UU. n.º 5.475.092, 6.340.701, 6.372.738 y 6.436.931, publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2001/0036923 A1, solicitud de patente de los EE. UU. pendiente n.º de ser. 10/024.290 y 10/116.053, y solicitud de patente internacional (PCT) n.º WO 01/49698), taxón, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, t. colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (p. ej., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo dacarbazina), agentes de ablación (p. ej., mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y *cis*-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino, antraciclinas (p. ej., daunorrubicina (previamente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (p. ej., dactinomicina (previamente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimitóticos (p. ej., vincristina y vinblastina). (Véase, p. ej., el documento US20090304721 de Seattle Genetics).

Otros ejemplos de citotoxinas que pueden conjugarse con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo (fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la divulgación incluyen duocarmicinas, calicheamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas.

En la técnica se conocen diversos tipos de citotoxinas, conectores y métodos para conjugar agentes terapéuticos con anticuerpos, véase, p. ej., Saito *et al.*, (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail *et al.*, (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan y Kreitman, (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter y Springer, (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente invención también se pueden conjugar con un isótopo radiactivo para generar radiofármacos citotóxicos, denominados radioinmunoconjugados. Los ejemplos de isótopos radiactivos que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero sin limitación, yodo-131, indio-111, iridio-90 y lutecio-177. En la técnica se han establecido métodos para preparar radioinmunoconjugados. Están disponibles en el mercado ejemplos de radioinmunoconjugados, incluidos Zevalin™ (DEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden utilizar métodos similares para preparar radioinmunoconjugados utilizando los anticuerpos de la invención. En determinadas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que puede fijarse al anticuerpo mediante una molécula conectora. Dichas moléculas conectoras son conocidas comúnmente en la técnica y se describen en Denardo *et al.*, (1998) *Clin Cancer Res.* 4(10):2483-90; Peterson *et al.*, (1999) *Bioconjug. Chem.* 10(4):553-7; y Zimmerman *et al.*, (1999) *Nucl. Med. Biol.* 26(8):943-50.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente invención también se pueden conjugar con una proteína o polipéptido heterólogo (o un fragmento del mismo, preferiblemente con un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. En particular, la invención proporciona proteínas de fusión que comprenden un fragmento de anticuerpo (p. ej., fragmento de unión a antígeno) descrito en el presente documento (p. ej., un fragmento Fab, fragmento Fd, fragmento Fv, fragmento F(ab)₂, un dominio VH, una CDR VH, un dominio VL o una CDR VL) y una proteína, polipéptido o péptido heterólogo.

Se pueden generar proteínas de fusión adicionales a través de las técnicas de redistribución de genes, redistribución de motivos, redistribución de exones y/o redistribución de codones (denominadas colectivamente "redistribución de ADN").

La redistribución de ADN puede emplearse para alterar las actividades de anticuerpos de la invención o fragmentos de los mismos (p. ej., anticuerpos o fragmentos de los mismos con afinidades mayores y velocidades de disociación menores). Véanse, en general, las patentes de los EE. UU. n.º 5.605.793, 5.811.238, 5.830.721, 5.834.252 y 5.837.458; Patten *et al.*, (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33; Harayama, (1998) *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82; Hansson *et al.*, (1999) *J. Mol. Biol.* 287:265-76; y Lorenzo y Blasco, (1998) *Biotechniques* 24(2):308-313. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos, o los anticuerpos codificados o fragmentos de los mismos, se pueden alterar sometiendo a mutagénesis aleatoria mediante PCR propensa a errores, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a un antígeno puede recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

Además, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente invención se pueden conjugar con secuencias marcadoras, tales como un péptido, para facilitar la purificación. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexahistidina (SEQ ID NO: 130), tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles en el mercado. Como se describe en Gentz *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 86: 821-824, por ejemplo, la hexahistidina (SEQ ID NO: 130) proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otros marcadores peptídicos útiles para la purificación incluyen, pero sin limitación, el marcador hemaglutinina ("HA"), que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe (Wilson *et al.*, (1984) *Cell* 37:767) y el marcador "FLAG" (A. Einhauser *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Methods* 49: 455-465, 2001). Según la presente invención, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno también pueden conjugarse con péptidos que penetran en tumores para mejorar su eficacia.

En otras realizaciones, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la presente invención se conjugan con un agente de diagnóstico o detectable. Dichos inmunoconjugados pueden ser útiles para controlar o pronosticar el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad o trastorno como parte de un procedimiento de prueba clínica, tal como determinar la eficacia de una terapia particular. Dicho diagnóstico y detección se pueden lograr acoplando el anticuerpo a sustancias detectables que incluyen, pero sin limitación, diversas enzimas, tales como, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero sin limitación, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 750, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficeotritina; materiales luminiscentes, tales como, pero sin limitación, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero sin limitación, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radiactivos, tales como, pero sin limitación, yodo (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I y ¹²¹I), carbono (¹⁴C), azufre (³⁵S), tritio (³H), indio (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In e ¹¹¹In), tecnecio (⁹⁹Tc), talio (²⁰¹Tl), galio (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladio (¹⁰³Pd), molibdeno (⁹⁹Mo), xenón (¹³³Xe), flúor (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ⁶⁴Cu, ¹¹³Sn y ¹¹⁷Sn; y metales emisores de positrones utilizando diversas tomografías por emisión de positrones y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o equivalentes funcionales de la invención también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Dichos soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio, celulosa, poliácridamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

2. Conector

Como se usa en el presente documento, un "conector" es cualquier porción química que sea capaz de unir un anticuerpo, fragmento de anticuerpo (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o equivalente funcional a otra porción, tal como una porción farmacológica. Los conectores pueden ser susceptibles a la escisión (conector escindible), tal como la escisión inducida por ácido, escisión fotoinducida, escisión inducida por peptidasa, escisión inducida por esterasa y escisión por enlace disulfuro, en condiciones en las que el compuesto o el anticuerpo permanece activo. Como alternativa, los conectores pueden ser sustancialmente resistentes a la escisión (p. ej., un conector estable o un conector no escindible). En algunos aspectos, el conector es un conector procargado, un conector hidrófilo o un conector a base de ácido dicarboxílico.

En un aspecto, el conector utilizado en la presente invención deriva de un reactivo de reticulación tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB), N-succinimidil yodoacetato (SIA), N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB), maleimida PEG NHS, N-succinimidil 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-sulfosuccinimidil 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (sulfo-SMCC) o 2,5-dioxopirrolidin-1-il 17-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetraazaheptadecan-1-oato (CX1-1).

Los conectores no escindibles son cualquier porción química capaz de unir un fármaco, tal como un maitansinoide, a un anticuerpo de manera estable y covalente, y no se incluyen en las categorías enumeradas anteriormente para conectores escindibles. Por lo tanto, los conectores no escindibles son sustancialmente resistentes a la escisión inducida por ácido, a la escisión fotoinducida, a la escisión inducida por peptidasa, a la escisión inducida por esterasa y a la escisión de enlaces disulfuro. Asimismo, no escindible se refiere a la capacidad del enlace químico en el conector o adyacente al conector para resistir la escisión inducida por un ácido, un agente de escisión fotolábil, una peptidasa, una esterasa o un compuesto químico o fisiológico que escinda un enlace disulfuro, en condiciones en las que el fármaco, tal como el maitansinoide o el anticuerpo, no pierde su actividad.

Los conectores lábiles frente a ácido son conectores que se pueden escindir a pH ácido. Por ejemplo, determinados compartimentos intracelulares, tales como los endosomas y los lisosomas, tienen un pH ácido (pH 4-5) y proporcionan condiciones adecuadas para escindir enlaces lábiles frente a ácido.

Los conectores fotolábiles son conectores que son útiles en la superficie del cuerpo y en muchas cavidades corporales que son accesibles a la luz. Además, la luz infrarroja puede penetrar en el tejido.

Algunos conectores pueden escindirse mediante peptidasas, es decir, son conectores escindibles por peptidasa. Solo determinados péptidos se escinden fácilmente dentro o fuera de las células, véase, p. ej., Trout *et al.*, 79 *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 626-629 (1982) y Umemoto *et al.* 43 *Int. J. Cancer*, 677-684 (1989). Asimismo, los péptidos están compuestos por α -aminoácidos y enlaces peptídicos, que químicamente son enlaces amida entre el carboxilato de un aminoácido y el grupo amino de un segundo aminoácido. Otros enlaces amida, tales como el enlace entre un carboxilato y el grupo α -amino de la lisina, no se consideran enlaces peptídicos y se consideran no escindibles.

Algunos conectores pueden escindirse mediante esterases, es decir, son conectores escindibles por esterasa. Nuevamente, solo determinados ésteres pueden ser escindidos por las esterases presentes dentro o fuera de las células. Los ésteres se forman por la condensación de un ácido carboxílico y un alcohol. Los ésteres simples son ésteres producidos con alcoholes simples, tales como alcoholes alifáticos y alcoholes cíclicos y aromáticos pequeños.

Los conectores procargados derivan de reactivos de reticulación cargados que conservan su carga después de la incorporación en un conjugado de anticuerpo y fármaco. Se pueden encontrar ejemplos de conectores procargados en el documento US 2009/0274713.

3. Conjugación y preparación de CAF

Los conjugados de la presente invención se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica, tales como los descritos en las patentes de los EE. UU. n.º 7.811.572, 6.411.163, 7.368.565 y 8.163.888, y las publicaciones de solicitudes de los EE. UU. 2011/0003969, 2011/0166319, 2012/0253021 y 2012/0259100.

Proceso de una etapa

En una realización, los conjugados de la presente invención se pueden preparar mediante un proceso de una etapa. El proceso comprende combinar el anticuerpo, el fármaco y el agente de reticulación en un medio sustancialmente acuoso, que contiene opcionalmente uno o más codisolventes, a un pH adecuado. En una realización, el proceso comprende la etapa de poner en contacto el anticuerpo de la presente invención con un fármaco (p. ej., DM1 o DM4) para formar una primera mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco, y después poner en contacto la primera mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco con un agente de entrecruzamiento (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para proporcionar una mezcla que comprende (i) el conjugado (p. ej., Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 o Ab-CX1-1-DM1), (ii) fármaco libre (p. ej., DM1 o DM4) y (iii) subproductos de la reacción.

En una realización, el proceso de una etapa comprende poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) y después el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) en una solución que tiene un pH de aproximadamente 6 o más (p. ej., de aproximadamente 6 a aproximadamente 9, de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, de aproximadamente 7 a aproximadamente 9, de aproximadamente 7 a aproximadamente 8,5, de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,5, de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8,0, de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 9,0 o de aproximadamente 8,5 a aproximadamente 9,0). Por ejemplo, el proceso de la invención comprende poner en contacto un agente de unión celular con el fármaco (DM1 o DM4) y después el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) en una solución que tiene un pH de aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,1, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,3, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,5, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,7, aproximadamente 6,8, aproximadamente 6,9, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,1, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,3, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,5, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,7, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,1, aproximadamente 8,2, aproximadamente 8,3, aproximadamente 8,4, aproximadamente 8,5, aproximadamente 8,6, aproximadamente 8,7, aproximadamente 8,8, aproximadamente 8,9 o aproximadamente 9,0. En

una realización específica, el proceso de la invención comprende poner en contacto un agente de unión celular con el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) y después el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) en una solución que tiene un pH de aproximadamente 7,8 (p. ej., un pH de 7,6 a 8,0 o un pH de 7,7 a 7,9).

5 El proceso de una etapa (es decir, poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) y después el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) se pueden llevar a cabo a cualquier temperatura adecuada conocida en la técnica. Por ejemplo, el proceso de una etapa puede realizarse a aproximadamente 20 °C o
10 20 °C, de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 18 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 16 °C), a temperatura ambiente (p. ej., de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C) o a una temperatura elevada (p. ej., de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 37 °C). En una realización, el proceso de una etapa se realiza a una temperatura de aproximadamente 16 °C a aproximadamente 24 °C (p. ej., aproximadamente 16 °C, aproximadamente 17 °C, aproximadamente 18 °C, aproximadamente 19 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C o aproximadamente 25 °C). En otra realización, el proceso de una etapa se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 15 °C o menos (p. ej., de aproximadamente -10 °C a aproximadamente 15 °C o de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 15 °C). Por ejemplo, el proceso comprende poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) y después el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) a una
20 temperatura de aproximadamente 15 °C, aproximadamente 14 °C, aproximadamente 13 °C, aproximadamente 12 °C, aproximadamente 11 °C, aproximadamente 10 °C, aproximadamente 9 °C, aproximadamente 8 °C, aproximadamente 7 °C, aproximadamente 6 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 4 °C, aproximadamente 3 °C, aproximadamente 2 °C, aproximadamente 1 °C, aproximadamente 0 °C, aproximadamente -1 °C, aproximadamente -2 °C, aproximadamente -3 °C, aproximadamente -4 °C, aproximadamente -5 °C, aproximadamente -6 °C, aproximadamente -7 °C, aproximadamente -8 °C, aproximadamente -9 °C o aproximadamente -10 °C, siempre que se evite que la solución se congele, p. ej., por la presencia de disolvente o disolventes orgánicos utilizados para disolver el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, Sulfo-SPDB o CX1-1). En una realización, el proceso comprende poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) y después el agente de reticulación (c SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) a una temperatura de aproximadamente -10 °C a aproximadamente 15 °C, de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 15 °C, de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 10 °C, de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C, de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 15 °C, de aproximadamente 10 °C a aproximadamente 15 °C o de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 10 °C. En otra realización, el proceso comprende poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) y después el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) a una temperatura de aproximadamente 10 °C (p. ej., una temperatura de 8 °C a 12 °C o una temperatura de 9 °C a 11 °C).

En una realización, el contacto descrito anteriormente se efectúa proporcionando el anticuerpo y poniendo después en contacto el anticuerpo con el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) para formar una primera mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) y después poner en contacto la primera mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco
40 (p. ej., DM1 o DM4) con el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1). Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo se proporciona en un recipiente de reacción, el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) se añade al recipiente de reacción (poniéndolo de este modo en contacto con el anticuerpo) y después el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) a la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) (poniendo de este modo en contacto la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco). En una realización, el anticuerpo se proporciona en un recipiente de reacción y el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) se añade al recipiente de reacción inmediatamente después de proporcionar el anticuerpo al recipiente. En otra realización, el anticuerpo se proporciona en un recipiente de reacción y el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) se añade al recipiente de reacción después de un intervalo de tiempo tras proporcionar el anticuerpo al recipiente (p. ej., aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1 día o más después de proporcionar el agente de unión a células al espacio). El fármaco (p. ej., DM1 o DM4) se pueden añadir rápidamente (es decir, en un intervalo de tiempo corto, tal como aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos) o lentamente (tal como usando una bomba).

La mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) pueden entonces ponerse en contacto con el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) ya sea inmediatamente después de poner el anticuerpo en contacto con el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) o en algún momento posterior (p. ej., de aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 8 horas o más) después de poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (p. ej., DM1 o DM4). Por ejemplo, en una realización, el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) se añade a la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) inmediatamente después de la adición del fármaco (p. ej., DM1 o DM4) al recipiente de reacción que comprende el anticuerpo. Como alternativa, la
60 mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) puede ponerse en contacto con el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) a aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas,

aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas o más después de que el anticuerpo entre en contacto con el fármaco (p. ej., DM1 o DM4).

- Después de que la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) se pone en contacto con el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) se permite que la reacción prosiga durante aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas o más (p. ej., aproximadamente 30 horas, aproximadamente 35 horas, aproximadamente 40 horas, aproximadamente 45 horas o aproximadamente 48 horas).
- En una realización, el proceso de una etapa comprende además un paso de inactivación para inactivar cualquier fármaco que no haya reaccionado (p. ej., DM1 o DM4) y/o agente de reticulación que no haya reaccionado (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1). La etapa de inactivación normalmente se realiza antes de la purificación del conjugado. En una realización, la mezcla se inactiva poniendo en contacto la mezcla con un reactivo de inactivación. Como se usa en el presente documento, el "reactivo de inactivación" se refiere a un reactivo que reacciona con el fármaco libre (p. ej., DM1 o DM4) y/o agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1). En una realización, se pueden usar reactivos de inactivación de maleimida o haloacetamida, tales como ácido 4-maleimidobutírico, ácido 3-maleimidopropiónico, N-etilmaleimida, yodoacetamida o ácido yodoacetamidopropiónico, para garantizar que cualquier grupo que no haya reaccionado (tal como tiol) en el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) se inactive. La etapa de extinción puede ayudar a prevenir la dimerización del fármaco (p. ej., DM1). La DM1 dimerizada puede resultar difícil de eliminar. Tras la inactivación con reactivos inactivadores de tiol polares y con carga (tales como el ácido 4-maleimidobutírico o el ácido 3-maleimidopropiónico), el exceso de DM1 que no ha reaccionado se convierte en un aducto polar, con carga y soluble en agua que se puede separar fácilmente del conjugado unido covalentemente durante la etapa de purificación. También se puede utilizar la inactivación con reactivos inactivadores de tiol neutros y no polares. En una realización, la mezcla se inactiva poniendo en contacto la mezcla con un reactivo de inactivación que reacciona con el agente de reticulación que no ha reaccionado (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1). Por ejemplo, se pueden añadir nucleófilos a la mezcla para inactivar cualquier SMCC que no haya reaccionado. El nucleófilo es preferiblemente un grupo amino que contiene un nucleófilo, tal como lisina, taurina e hidroxilamina.
- En una realización preferida, se permite que la reacción (es decir, poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) y después el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1)) prosiga hasta su finalización antes de poner en contacto la mezcla con un reactivo de inactivación. A este respecto, el reactivo de inactivación se añade a la mezcla de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas (p. ej., aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas o de aproximadamente 25 horas a aproximadamente 48 horas) después de que la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) se ponga en contacto con el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1).
- Como alternativa, la mezcla se inactiva reduciendo el pH de la mezcla a aproximadamente 5,0 (p. ej., 4,8, 4,9, 5,0, 5,1 o 5,2). En otra realización, la mezcla se inactiva reduciendo el pH a menos de 6,0, menos de 5,5, menos de 5,0, menos de 4,8, menos de 4,6, menos de 4,4, menos de 4,2, menos de 4,0. Como alternativa, el pH se reduce hasta de aproximadamente 4,0 (p. ej., 3,8, 3,9, 4,0, 4,1 o 4,2) a aproximadamente 6,0 (p. ej., 5,8, 5,9, 6,0, 6,1 o 6,2), de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 5,0, de aproximadamente 4,5 (p. ej., 4,3, 4,4, 4,5, 4,6 o 4,7) a aproximadamente 5,0. En una realización, la mezcla se inactiva reduciendo el pH de la mezcla a 4,8. En otra realización, la mezcla se inactiva reduciendo el pH de la mezcla a 5,5.
- En una realización, el proceso de una etapa comprende además una etapa de retención para liberar del anticuerpo los conectores unidos de forma inestable. La etapa de retención comprende mantener la mezcla antes de la purificación del conjugado (p. ej., después de la etapa de reacción, entre la etapa de reacción y la etapa de extinción o después de la etapa de extinción). Por ejemplo, el proceso comprende (a) poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) para formar una mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (p. ej., DM1 o DM4); y después poner en contacto la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) con el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1), en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para proporcionar una mezcla que comprende (i) el conjugado (p. ej., Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 o Ab-CX1-1-DM1), (ii) fármaco libre (p. ej., DM1 o DM4) y (iii) subproductos de la reacción, (b) mantener la mezcla preparada en la etapa (a) para liberar los conectores unidos de manera inestable del agente de unión a células y (c) purificar la mezcla para proporcionar un conjugado purificado.

En otra realización, el proceso comprende (a) poner en contacto el anticuerpo con el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) para formar una mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (p. ej., DM1 o DM4); y después poner en contacto la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) con el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1), en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para proporcionar una mezcla que comprende (i) el conjugado, (ii) el fármaco libre (p. ej., DM1 o DM4) y (iii) subproductos de la reacción, (b) inactivar la mezcla preparada en la etapa (a) para inactivar cualquier fármaco que no haya reaccionado (p. ej., DM1 o DM4) y/o agente de reticulación que no haya reaccionado (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1), (c) mantener la mezcla preparada en la etapa (b) para liberar los conectores unidos de manera inestable del agente de unión a células y (d) purificar la mezcla para proporcionar un conjugado purificado (p. ej., Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 o Ab-CX1-1-DM1).

Como alternativa, la etapa de retención se puede realizar después de la purificación del conjugado, seguido de una etapa de purificación adicional.

En una realización preferida, se deja que la reacción prosiga hasta su finalización antes de la etapa de retención. A este respecto, la etapa de retención se puede realizar de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 48 horas (p. ej., aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas o de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 48 horas) después de que la mezcla que comprende el anticuerpo y el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) se ponga en contacto con el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1).

La etapa de retención comprende mantener la solución a una temperatura adecuada (p. ej., de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 37 °C) durante un periodo de tiempo adecuado (p. ej., de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 8 horas o de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 4 horas) para liberar del anticuerpo los conectores unidos de manera inestable sin liberar sustancialmente del anticuerpo los conectores unidos de manera estable. En una realización, la etapa de retención comprende mantener la solución a aproximadamente 20 °C o menos (p. ej., de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 18 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 16 °C), a temperatura ambiente (p. ej., de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C o de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C) o a una temperatura elevada (p. ej., de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 37 °C). En una realización, la etapa de retención comprende mantener la solución a una temperatura de aproximadamente 16 °C a aproximadamente 24 °C (p. ej., aproximadamente 15 °C, aproximadamente 16 °C, aproximadamente 17 °C, aproximadamente 18 °C, aproximadamente 19 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C o aproximadamente 25 °C). En otra realización, la etapa de retención comprende mantener la solución a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C (p. ej., aproximadamente 0 °C, aproximadamente 1 °C, aproximadamente 2 °C, aproximadamente 3 °C, aproximadamente 4 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 6 °C, aproximadamente 7 °C, aproximadamente 8 °C, aproximadamente 9 °C o aproximadamente 10 °C). En otra realización, la etapa de retención comprende mantener la solución a una temperatura de aproximadamente 37 °C (p. ej., aproximadamente 34 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 36 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 38 °C, aproximadamente 39 °C o aproximadamente 40 °C).

La duración de la etapa de retención depende de la temperatura y el pH al que se realiza la etapa de retención. Por ejemplo, la duración de la etapa de retención se puede reducir sustancialmente realizando la etapa de retención a temperatura elevada, con la temperatura máxima limitada por la estabilidad del conjugado de agente de unión celular-agente citotóxico. La etapa de retención puede comprender mantener la solución durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1 día (p. ej., aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 22 horas o aproximadamente 24 horas), de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 24 horas, aproximadamente de 12 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 14 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 16 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 20 horas a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 20 horas a aproximadamente 1 semana, de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 1 semana (p. ej., aproximadamente 12 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días o aproximadamente 7 días), o de aproximadamente 1 día a aproximadamente 1 semana.

En una realización, la etapa de retención comprende mantener la solución a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C durante un periodo de al menos aproximadamente 12 horas durante hasta una semana. En otra realización, la etapa de retención comprende mantener la solución a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C durante una noche (p. ej., de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas, preferiblemente aproximadamente 20 horas).

El valor de pH para la etapa de retención es preferiblemente de aproximadamente 4 a aproximadamente 10. En una realización, el valor de pH para la etapa de retención es aproximadamente 4 o más, pero menos de aproximadamente 6 (p. ej., de 4 a 5,9) o aproximadamente 5 o más, pero menos de aproximadamente 6 (p. ej., de 5 a 5,9). En otra realización, los valores de pH para la etapa de mantenimiento oscilan de aproximadamente 6 a aproximadamente 10 (p. ej., de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 9, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8). Por ejemplo, los valores de pH para la etapa de retención pueden ser aproximadamente 6, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5, aproximadamente 8, aproximadamente 8,5, aproximadamente 9, aproximadamente 9,5 o aproximadamente 10.

En realizaciones específicas, la etapa de retención puede comprender incubar la mezcla a 25 °C a un pH de aproximadamente 6-7,5 durante aproximadamente 12 horas a aproximadamente 1 semana, incubar la mezcla a 4 °C a un pH de aproximadamente 4,5-5,9 durante aproximadamente 5 horas a aproximadamente 5 días o incubar la mezcla a 25 °C a un pH de aproximadamente 4,5-5,9 durante aproximadamente 5 horas a aproximadamente 1 día.

El proceso de una etapa puede incluir opcionalmente la adición de sacarosa a la etapa de reacción para aumentar la solubilidad y la recuperación de los conjugados. Convenientemente, se añade sacarosa a una concentración de aproximadamente 0,1 % (p/v) a aproximadamente 20 % (p/v) (p. ej., aproximadamente 0,1 % (p/v), 1 % (p/v), 5 % (p/v), 10 % (p/v), 15 % (p/v) o 20 % (p/v)). Preferiblemente, se añade sacarosa a una concentración de aproximadamente 1 % (p/v) a aproximadamente 10 % (p/v) (p. ej., aproximadamente 0,5 % (p/v), aproximadamente 1 % (p/v), aproximadamente 1,5 % (p/v), aproximadamente 2 % (p/v), aproximadamente 3 % (p/v), aproximadamente 4 % (p/v), aproximadamente 5 % (p/v), aproximadamente 6 % (p/v), aproximadamente 7 % (p/v), aproximadamente 8 % (p/v), aproximadamente 9 % (p/v), aproximadamente 10 % (p/v) o aproximadamente 11 % (p/v)). Además, la etapa de reacción también puede comprender la adición de un agente tamponante. Puede usarse cualquier agente tamponante adecuado conocido en la técnica. Los agentes tamponantes adecuados incluyen, por ejemplo, un tampón citrato, un tampón acetato, un tampón succinato y un tampón fosfato. En una realización, el agente tamponante se selecciona del grupo que consiste en HEPPSO (N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-hidroxi-propanosulfónico)), POPSO (piperazina-1,4-bis-(ácido 2-hidroxi-propano-sulfónico) deshidratado), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico), HEPPS (EPPS) (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-propanosulfónico), TES (ácido N-[tris(hidroximetil)metil]-2-aminoetanosulfónico) y una combinación de los mismos.

En una realización, el proceso de una etapa puede comprender además la etapa de purificar la mezcla para proporcionar un conjugado purificado (p. ej., Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 o Ab-CX1-1-DM1). Se puede utilizar cualquier método de purificación conocido en la técnica para purificar los conjugados de la presente invención. En una realización, los conjugados de la presente invención usan filtración de flujo tangencial (TFF), cromatografía no adsorbente, cromatografía adsorbente, filtración adsorbente, precipitación selectiva o cualquier otro proceso de purificación adecuado, así como combinaciones de los mismos. En otra realización, antes de someter los conjugados al proceso de purificación descrito anteriormente, los conjugados se filtran primero a través de una o más membranas de PVDF. Como alternativa, los conjugados se filtran a través de una o más membranas de PVDF después de someter los conjugados al proceso de purificación descrito anteriormente. Por ejemplo, en una realización, los conjugados se filtran a través de una o más membranas de PVDF y después se purifican usando filtración de flujo tangencial. Como alternativa, los conjugados se purifican usando filtración de flujo tangencial y después se filtran a través de una o más membranas de PVDF.

Se puede utilizar cualquier sistema TFF adecuado para la purificación, incluido un sistema tipo Pellicon (Millipore, Billerica, MA), un sistema de casete Sartocoon (Sartorius AG, Edgewood, NY) y un sistema tipo Centrasette (Pall Corp., East Hills, NY).

Para la purificación se puede utilizar cualquier resina de cromatografía de adsorción adecuada. Las resinas de cromatografía de adsorción preferidas incluyen cromatografía de hidroxapatita, cromatografía de inducción de carga hidrófoba (HCIC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio iónico de modo mixto, cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC), cromatografía de ligando colorante, cromatografía de afinidad, cromatografía de fase inversa y combinaciones de las mismas. Los ejemplos de resinas de hidroxapatita adecuadas incluyen hidroxapatita cerámica (CHT de tipo I y tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), hidroxapatita HA Ultrogel (Pall Corp., East Hills, NY) y fluoroapatita cerámica (CFT de tipo I y tipo II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Un ejemplo de una resina HCIC adecuada es la resina MEP Hypercel (Pall Corp., East Hills, NY). Los ejemplos de resinas HIC adecuadas incluyen resinas de butil-Sepharose, hexil-Sepharose, fenil-Sepharose y octil-Sepharose (todas de GE Healthcare, Piscataway, NJ), así como resinas Macro-prep de metilo y Macro-Prep de t-butilo (Biorad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de resinas de intercambio iónico adecuadas incluyen resinas de SP-Sepharose, CM-Sepharose y Q-Sepharose (todas de GE Healthcare, Piscataway, NJ) y resina Unosphere S (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de intercambiadores iónicos de modo mixto adecuados incluyen la resina

Bakerbond ABx (JT Baker, Phillipsburg NJ). Los ejemplos de resinas de IMAC adecuadas incluyen resina de Sepharose quelante (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y resina IMAC Profinity (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de resinas de ligando colorante adecuadas incluyen resina de Blue Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y resina Affigel Blue (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Los ejemplos de resinas de afinidad adecuadas incluyen resina de Proteína A Sepharose (p. ej., MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ) y resinas de afinidad de lectina, p. ej., resina de lectina de las lentejas-Sepharose (GE Healthcare, Piscataway, NJ), donde el anticuerpo tiene sitios de unión a lectina adecuados. Los ejemplos de resinas de fase inversa adecuadas incluyen resinas C4, C8 y C18 (Grace Vydac, Hesperia, CA).

Para la purificación se puede utilizar cualquier resina de cromatografía no adsorbente adecuada. Los ejemplos de resinas de cromatografía no adsorbentes adecuadas incluyen, pero sin limitación, SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, resinas SEPHACRYL™ (p. ej., S-200 y S-300), resinas SUPERDEX™ (p. ej., SUPERDEX™ 75 y SUPERDEX™ 200), resinas BIO-GEL® (p. ej., P-6, P-10, P-30, P-60 y P-100) y otras conocidas por los expertos en la materia.

Proceso de dos etapas y proceso de un solo recipiente

En una realización, los conjugados de la presente invención se pueden preparar como se describe en la patente de los EE. UU. 7.811.572 y la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2006/0182750. El proceso comprende las etapas de (a) poner en contacto el anticuerpo de la presente invención con el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1) para unir covalentemente el conector (es decir, Ab-SMCC, Ab-SPDB o Ab-CX1-1) al anticuerpo y preparar de este modo una primera mezcla que comprende el anticuerpo que tiene el conector unido al mismo; (b) opcionalmente someter la primera mezcla a un proceso de purificación para preparar una primera mezcla purificada del anticuerpo que tiene el conector unido al mismo; (c) conjugar el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) con el anticuerpo que tiene el conector unido al mismo en la primera mezcla haciendo reaccionar el anticuerpo que tiene el conector unido al mismo con el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) en una solución que tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 9 para preparar una segunda mezcla que comprende (i) conjugado (p. ej., Ab-MCC-DM1, Ab-SPDB-DM4 o Ab-CX1-1-DM1), (ii) fármaco libre (p. ej., DM1 o DM4); y (iii) subproductos de la reacción; y (d) someter la segunda mezcla a un proceso de purificación para purificar el conjugado de los otros componentes de la segunda mezcla. Como alternativa, se puede omitir la etapa de purificación (b). Para las etapas (b) y (d) se puede utilizar cualquier método de purificación descrito en el presente documento. En una realización, se usa TFF para ambas etapas (b) y (d). En otra realización, se usa TFF para la etapa (b) y se usa la cromatografía de absorción (p. ej., CHT) para la etapa (d).

Reactivo de una etapa y proceso in situ

En una realización, los conjugados de la presente invención se pueden preparar conjugando el compuesto de conector-fármaco preformado (p. ej., SMCC-DM1, Sulfo-SMCC-DM1, SPDB-DM4 o CX1-1-DM1) con el anticuerpo de la presente invención, como se describe en la patente de los EE. UU. 6.441.163 y las publicaciones de solicitudes de patente de los EE. UU. n.º 2011/0003969 y 2008/0145374, seguido de una etapa de purificación. Se puede utilizar cualquier método de purificación descrito en el presente documento. El compuesto de conector-fármaco se prepara haciendo reaccionar el fármaco (p. ej., DM1 o DM4) con el agente de reticulación (p. ej., SMCC, Sulfo-SMCC, SPDB, Sulfo-SPDB o CX1-1). El compuesto de conector-fármaco (p. ej., SMCC-DM1, Sulfo-SMCC-DM1, SPDB-DM4 o CX1-1-DM1) se somete opcionalmente a purificación antes de conjugarse con el anticuerpo.

Anticuerpos anti-P-cadherina

La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a la P-cadherina humana. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) de la invención incluyen los anticuerpos monoclonales humanos o fragmentos de los mismos aislados como se describe en los ejemplos y como se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona en determinadas realizaciones anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a P-cadherina, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7. La presente divulgación también proporciona en determinadas realizaciones anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a P-cadherina, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) una CDR VH que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR VH enumeradas en la tabla 1. En realizaciones particulares, la divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a P-cadherina, en donde dichos anticuerpos comprenden (o, como alternativa, consisten en) una, dos, tres, cuatro, cinco o más CDR VH que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR VH enumeradas en la tabla 1 posterior.

La presente invención proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a P-cadherina, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17. La presente divulgación también proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se

- unen específicamente a P-cadherina, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) comprenden una CDR VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR VL enumeradas en la tabla 1 posterior. En particular, la divulgación proporciona anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a P-cadherina, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) comprenden (o, como alternativa, consisten en) una, dos, tres o más CDR VL que tienen una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las CDR VL enumeradas en la tabla 1 posterior.
- Otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) de la divulgación incluyen aminoácidos que se han mutado, pero que tienen al menos un 60, 70, 80, 90 o 95 por ciento de identidad en las regiones CDR con las regiones CDR representadas en las secuencias descritas en la tabla 1. En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden secuencias de aminoácidos mutantes en donde no se han mutado más de 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en las regiones CDR en comparación con las regiones CDR representadas en la secuencia descrita en la tabla 1.
- La presente invención también proporciona secuencias de ácidos nucleicos que codifican la VH, la VL, la cadena pesada de longitud completa y la cadena ligera de longitud completa de los anticuerpos de la invención. Dichas secuencias de ácidos nucleicos se pueden optimizar para su expresión en células de mamífero.

Tabla 1. Ejemplos de anticuerpos anti-P-cadherina

NOV169N31Q		
SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 1	HCDR1 (Kabat)	SQSAAWN
SEQ ID NO: 2	HCDR2 (Kabat)	RIYYRSKWYNDYALSVKS
SEQ ID NO: 3	HCDR3 (Kabat)	GEGYGREGFAI
SEQ ID NO: 4	HCDR1 (Chothia)	GDSVSSQSA
SEQ ID NO: 5	HCDR2 (Chothia)	YYRSKWY
SEQ ID NO: 6	HCDR3 (Chothia)	GEGYGREGFAI
SEQ ID NO: 7	VH	QVQLQQSGPGLVKPSQTLTCAISGDSVSSQSAAWNWI RQSPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYALSVKSRITINPDTS KNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGEGYGREGFAIWGQGT LVTVSS
SEQ ID NO: 8	VH de ADN	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGCCCTGGCCTGGTCAAG CCTAGTCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCTATTAGCGGC GATAGTGTGTCTAGTCAGTCAGCCGCTGGAAGTGGATT AGACAGTCACCCTCTAGGGGCTGGAGTGGCTGGGTAGA ATCTACTATAGGTCTAAGTGGTATAACGACTACGCCCTG AGCGTGAAGTCTAGGATCACTATTAACCCGACACCTCT AAGAATCAGTTTAGCCTGCAGCTGAATAGCGTGACCCCC
		GAGGACACCGCGTCTACTACTGCGCTAGAGGCGAGGGC TACGGTAGAGAGGGCTTCGCTATCTGGGGTCAGGGCACC CTGGTCACCGTGTCTAGC
SEQ ID NO: 9	Cadena pesada	

NOV169N31Q		
SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		<p>QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSQSAAWNWI RQSPSRGLEWLGRIYYRSKWYNDYALSVKSRITINPDT KNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARGEGYREGFAIWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTCTCP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
SEQ ID NO: 10	Cadena pesada de ADN	<p>CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGCCCTGGCCTGGTCAAG CCTAGTCAGACCCTGAGCCTGACCTGCGCTATTAGCGGC GATAGTGTGTCTAGTCAGTCAGCCGCTGGAACCTGGATT AGACAGTCACCCTCTAGGGGCTGGAGTGGCTGGGTAGA ATCTACTATAGGTCTAAGTGGTATAACGACTACGCCCTG AGCGTGAAGTCTAGGATCACTATTAACCCGACACCTCT AAGAATCAGTTTAGCCTGCAGCTGAATAGCGTGACCCCC GAGGACACCGCGTCTACTACTGCGCTAGAGGCGAGGGC TACGGTAGAGAGGGCTTCGCTATCTGGGGTCAGGGCACC CTGGTCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCAAGT GTGTTTCCCTGGCCCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGC GGAACCTGCTGCCCTGGGTGCTGCTGGAAGGACTACTTC CCCGAGCCCGTGACAGTGTCTGGAACCTGGGGCTCTG ACTTCCGGCGTGACACACCTTCCCCGCGTGCTGCAGAGC AGCGGCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCC TCCAGCTCTCTGGGAACCCAGACCTATATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTG GAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCC TGCCAGCTCCAGAACTGCTGGGAGGGCTTCCGTGTTC CTGTTCCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGC AGGACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCC CACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAG GAGCAGTACAACAGCACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTG ACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAATAC AAGTGCAAAGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATC GAAAAGACAATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAG CCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGC TTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAC GGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCAGTG CTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTG ACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC AGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTAC ACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAG</p>
SEQ ID NO: 11	LCDR1 (Kabat)	RASQTISNTLA

NOV169N31Q		
SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
SEQ ID NO: 12	LCDR2 (Kabat)	AASNLQS
SEQ ID NO: 13	LCDR3 (Kabat)	QQYLSWFT
SEQ ID NO: 14	LCDR1 (Chothia)	SQTISNT
SEQ ID NO: 15	LCDR2 (Chothia)	AAS
SEQ ID NO: 16	LCDR3 (Chothia)	YLSWF
SEQ ID NO: 17	VL	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTISNTLAWYQQK PGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYLSWFTFGQGTKVEIK</p>
SEQ ID NO: 18	VL de ADN	<p>GATATTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCT AGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCT CAGACTATCTCTAACACCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCCGGTAAAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCT AACCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGC GGTAGTGGCACC GACTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTG CAGCCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGTAC CTGAGCTGGTTTCACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAG ATTAAG</p>
SEQ ID NO: 19	Cadena ligera	<p>DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTISNTLAWYQQK PGKAPKLLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYLSWFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
SEQ ID NO 20:	Cadena ligera de ADN	

NOV169N31Q		
SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		GATATTTCAGATGACTCAGTCACCTAGTAGCCTGAGCGCT AGTGTGGGCGATAGAGTGACTATCACCTGTAGAGCCTCT CAGACTATCTCTAACACCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAG CCCGGTAAAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCT AACCTGCAGTCAGGCGTGCCCTCTAGGTTTAGCGGTAGC GGTAGTGGCACCAGCTTCACCCTGACTATTAGTAGCCTG CAGCCCCGAGGACTTCGCTACCTACTACTGTCAGCAGTAC CTGAGCTGGTTCACCTTCGGTCAGGGCACTAAGGTCGAG ATTAAGCGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTTCATCTTC CCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGC GTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCC AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC AACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGAC TCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAG GCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGCCTGCCGAGGTG ACCCACCCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTC AACAGGGGGCGAGTGC
NEG0012		
SEQ ID NO: 21	HCDR1 (Kabat)	DHTIH
SEQ ID NO: 22	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSINYNEKFKG
SEQ ID NO: 23	HCDR3 (Kabat)	RNLFLPMEY
SEQ ID NO: 24	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH
SEQ ID NO: 25	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS
SEQ ID NO: 26	HCDR3 (Chothia)	RNLFLPMEY
SEQ ID NO: 27	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVSGYTFTDHTIHWMRQ MPGKGLEWMGYIYPRSGSINYNEKFKGQVTISADKSSST AYLQWSSLKASDTAMYICARRNLFLPMEYWGQGLVTVS S
SEQ ID NO: 28	VH de ADN	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAG CCCGGCGAGTCACTGAAGATTAGCTGTAAAGTCTCAGGC TACACCTTCACCGATCACACTATTCACTGGATGAGACAG ATGCCCCGTAAAGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTAC CCTAGATCAGGCTCTATTAACATAACGAGAAGTTTAAG GGTCAGGTCACAATTAGCGCCGATAAGTCTAGCTCTACC GCCTACCTGCAGTGGTCTAGCCTGAAGGCTAGTGACACC GCTATGTACTACTGCGCTAGACGTAACCTGTTCCCTGCCT ATGGAATACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCT AGC
SEQ ID NO: 29	Cadena pesada	

NOV169N31Q		
SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVSGYTFTDHTIHWMRQ MPGKGLEWMGYIYPRSGSINYNEKFKGQVTISADKSSST AYLQWSSLKASDTAMYICARRNLFPMYWGQGLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 30	Cadena pesada de ADN	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAG CCCGGCGAGTCACTGAAGATTAGCTGTAAAGTCTCAGGC TACACCTTCACCGATCACACTATTCACTGGATGAGACAG ATGCCCCGTAAAGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTAC CCTAGATCAGGCTCTATTAACATAACGAGAAGTTTAAG GGTCAAGTCACAATTAGCGCCGATAAGTCTAGCTCTACC GCCTACCTGCAGTGGTCTAGCCTGAAGGCTAGTGACACC GCTATGTACTACTGCGCTAGACGTAACCTGTTCCCTGCCT ATGGAATACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCT AGCGCTAGCACTAAGGGCCCAAGTGTGTTCCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAAGTGTGCCCTG GGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACA

NOV169N31Q		
SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		GTGTCCTGGAACCTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGACAC ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGC CTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGA ACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGC GACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCCAGCTCCAGAA CTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTCCTCCCCCAAG CCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAG GTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC AACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGC ACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCC AACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGAT ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAAC AACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGC AGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC AGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCAGCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTG AGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 31	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLSSGDQKNYLT
SEQ ID NO: 32	LCDR2 (Kabat)	WASTRES
SEQ ID NO: 33	LCDR3 (Kabat)	QNDYRYPLT
SEQ ID NO: 34	LCDR1 (Chothia)	SQSLSSGDQKNY
SEQ ID NO: 35	LCDR2 (Chothia)	WAS
SEQ ID NO: 36	LCDR3 (Chothia)	DYRYPL
SEQ ID NO: 37	VL	DIVMTQTPLSLPVTGPGEFASISCRSSQSLSSGDQKNYL TWYLQKPGQSPQLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSDFT LKISRVEAEDVGVYYCQNDYRYPLTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 38	VL de ADN	GATATCGTGATGACTCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCGTG ACCCCTGGCGAGCCTGCCTCTATTAGCTGTAGATCTAGT CAGTCACTGCTGTCTAGCGCGATCAGAAGAACTACCTG ACCTGGTATCTGCAGAAGCCCGGTGAGTACCTCAGCTG CTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGAATCAGGCGTGCCC GATAGGTTTACGGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACC CTGAAGATCTCTAGGGTGGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTC TACTACTGTGAGAACGACTATAGATAACCCCTGACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATTAAAG
SEQ ID NO: 39	Cadena ligera	

NOV169N31Q		
SEQ ID NO.	Descripción	Secuencia
		DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSSGDQKNYL TWYLQKPGQSPQLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCQNDYRYPLTFGQGTKLEIKRTVA
		APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 40:	Cadena ligera de ADN	GATATCGTGATGACTCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTG ACCCCTGGCGAGCCTGCCTCTATTAGCTGTAGATCTAGT CAGTCACTGCTGTCTAGCGGCGATCAGAAGAACTACCTG ACCTGGTATCTGCAGAAGCCCGGTGAGTCACCTCAGCTG CTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGAATCAGGCGTGCCC GATAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCAGCTTCACC CTGAAGATCTCTAGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTC TACTACTGTCAGAACGACTATAGATACCCCTGACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAG CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTC ACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT AAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC

NEG0013		
SEQ ID NO: 41	HCDR1 (Kabat)	DHTIH
SEQ ID NO: 42	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSINYNEKFKG
SEQ ID NO: 43	HCDR3 (Kabat)	RNLFLPMEY
SEQ ID NO: 44	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH
SEQ ID NO: 45	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS
SEQ ID NO: 46	HCDR3 (Chothia)	RNLFLPMEY
SEQ ID NO: 47	VH	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVSGYTFTDHTIHWMRQ MPGKGLEWMGYIYPRSGSINYNEKFKGQVTISADKSSST AYLQWSSLKASDTAMYYCARRNLFLPMEYWGQGLVTVS S
SEQ ID NO: 48	VH de ADN	

NEG0013		
		GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAG CCCGGCGAGTCACTGAAGATTAGCTGTAAAGTCTCAGGC TACACCTTCACCGATCACACTATTCACTGGATGAGACAG ATGCCCCGTAAAGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTAC CCTAGATCAGGCTCTATTAACATAACGAGAAGTTTAAG GGTCAGGTCAACAATTAGCGCCGATAAGTCTAGCTCTACC GCCTACCTGCAGTGGTCTAGCCTGAAGGCTAGTGACACC GCTATGTACTACTGCGCTAGACGTAACCTGTTCCCTGCCT ATGGAATACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCT AGC
SEQ ID NO: 49	Cadena pesada	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKVSGYTFTDHTIHWMRQ MPGKGLEWMGYIYPRSGSINYNEKFKGQVTISADKSSST
		AYLQWSSLKASDTAMYYCARRNLFLPMEYWGQGTTLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 50	Cadena pesada de ADN	

NEG0013		
		<p>GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAG CCCGGCGAGTCACTGAAGATTAGCTGTAAAGTCTCAGGC TACACCTTCACCGATCACACTATTCACTGGATGAGACAG ATGCCCCGTAAAGGCCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTAC CCTAGATCAGGCTCTATTAACATAACGAGAAGTTAAG GGTCAAGTCAACAATTAGCGCCGATAAGTCTAGCTCTACC GCCTACCTGCAGTGGTCTAGCCTGAAGGCTAGTGACACC GCTATGTACTACTGCGCTAGACGTAACCTGTTCCCTGCCT ATGGAATACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGICT AGCGCTAGCACTAAGGGCCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAAGTGTGCCCTG GGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACA GTGTCCTGGAAGTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGAC ACCTTCCCCCGCGTGCTGCAGAGCAGCGCCCTGTACAGC CTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGA ACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGC GACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAA CTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTTCTGTTCCCCCCCCAAG CCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAG GTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC AACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGC ACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCC AACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGAT ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCAGAAC AACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGC AGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC AGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCACTGCAGCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTG AGCCTGAGCCCCGGCAAG</p>
SEQ ID NO: 51	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLSSGNQKNYLT
SEQ ID NO: 52	LCDR2 (Kabat)	WASTRES
SEQ ID NO: 53	LCDR3 (Kabat)	QNDYSYPLT
SEQ ID NO: 54	LCDR1 (Chothia)	SQSLSSGNQKNY
SEQ ID NO: 55	LCDR2 (Chothia)	WAS
SEQ ID NO: 56	LCDR3 (Chothia)	DYSYPL
SEQ ID NO: 57	VL	<p>DIVMTQTPLSLFVTPGEPASISCRSSQSLSSGNQKNYL TWYLQKPGQSPQLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSTDF LKISRVEAEDVGVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK</p>
SEQ ID NO: 58	VL de ADN	

NEG0013		
		GATATCGTGATGACTCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTG ACCCCTGGCGAGCCTGCCTCTATTAGCTGTAGATCTAGT CAGTCACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGAACTACCTG ACCTGGTATCTGCAGAAGCCCGGTACAGTCACCTCAGCTG CTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGAATCAGGCGTGCCC GATAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACC CTGAAGATCTCTAGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTC TACTACTGTCAGAACGACTATAGCTACCCCTGACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATTAAG
SEQ ID NO: 59	Cadena ligera	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSSGNQKNYL TWYLOKPGQSPQLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHH KYYACEVTHOGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO 60:	Cadena ligera de ADN	GATATCGTGATGACTCAGACCCCCCTGAGCCTGCCCCGTG ACCCCTGGCGAGCCTGCCTCTATTAGCTGTAGATCTAGT CAGTCACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGAACTACCTG ACCTGGTATCTGCAGAAGCCCGGTACAGTCACCTCAGCTG CTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGAATCAGGCGTGCCC GATAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACC CTGAAGATCTCTAGGGTGGAAGCCGAGGACGTGGGCGTC TACTACTGTCAGAACGACTATAGCTACCCCTGACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCCAGCGACGAGCAG CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGCTGAAC AACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTC ACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT AAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
NEG0016		
SEQ ID NO: 61	HCDR1 (Kabat)	DHTLH
SEQ ID NO: 62	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSTKYNENFRG
SEQ ID NO: 63	HCDR3 (Kabat)	RLFLPLDY
SEQ ID NO: 64	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH
SEQ ID NO: 65	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS
SEQ ID NO: 66	HCDR3 (Chothia)	RLFLPLDY
SEQ ID NO: 67	VH	

NEG0013		
		<p>QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKVSGYTFTDHTLHWMRQ APGQGLEWMGYIYPRSGSTKYNENFRGRVTITADTSSST AYMELSSLRSEDTAVYYCARRLLFLPLDYWGQGLVTVS S</p>
SEQ ID NO: 68	VH de ADN	<p>CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAA CCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTCTCAGGC TACACCTTCACCGATCACACCCTGCACTGGATGAGACAG GCCCCAGGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTAC CCTAGATCAGGCTCTACTAAGTATAACGAGAACCTTTAGG GGTAGAGTGACTATCACCGCCGACACTAGCTCTAGCACC GCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACC GCCGTCTACTACTGCGCTAGACGGCTGCTGTTCCCTGCCC CTGGACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCT AGC</p>
SEQ ID NO: 69	Cadena pesada	<p>QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKVSGYTFTDHTLHWMRQ APGQGLEWMGYIYPRSGSTKYNENFRGRVTITADTSSST AYMELSSLRSEDTAVYYCARRLLFLPLDYWGQGLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
SEQ ID NO: 70	Cadena pesada de ADN	<p>CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAA CCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTCTCAGGC TACACCTTCACCGATCACACCCTGCACTGGATGAGACAG GCCCCAGGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTAC CCTAGATCAGGCTCTACTAAGTATAACGAGAACCTTTAGG GGTAGAGTGACTATCACCGCCGACACTAGCTCTAGCACC GCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACC GCCGTCTACTACTGCGCTAGACGGCTGCTGTTCCCTGCCC CTGGACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCT AGCGCTAGCACTAAGGGCCCAAGTGTGTTTCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAAGTGTGCCCTG GGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACA GTGTCTTGGAACTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGCAC ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGC CTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGA ACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGC GACAAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCTCCAGAA</p>

NEG0013		
		CTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCCCTGTTCCCCCAAG CCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAG GTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC AACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGC ACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGTGCAAAGTCTCC AACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGAT ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAAC AACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGC AGCTTCTTCCGTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC AGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTACGTGCAGCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTG AGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 71	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLSSGNQKSYLT
SEQ ID NO: 72	LCDR2 (Kabat)	WASTRES
SEQ ID NO: 73	LCDR3 (Kabat)	QNDYSPFT
SEQ ID NO: 74	LCDR1 (Chothia)	SQSLSSGNQKSY
SEQ ID NO: 75	LCDR2 (Chothia)	WAS
SEQ ID NO: 76	LCDR3 (Chothia)	DYSYPF
SEQ ID NO: 77	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSLSSGNQKSYL TWYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFAVYYCQNDYSPFTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 78	VL de ADN	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCCTG AGCCCTGGCGAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGATCTAGT CAGTCACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGTCTTACCTG ACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAGGCCCCTAGACTG CTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATCCCC GCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACC CTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTC TACTACTGTCAGAACGACTATAGCTACCCCTTCACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATTAAG
SEQ ID NO: 79	Cadena ligera	

ES 2 987 508 T3

NEG0013		
		EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSLSSGNQKSYL TWYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFAVYYCQNDYSYPFTFGQGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 80:	Cadena ligera de ADN	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACCCCTGAGCCTG AGCCCTGGCGAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGATCTAGT CAGTCACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGTCCTACCTG
		ACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAGGCCCTAGACTG CTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATCCCC GCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACC CTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTC TACTACTGTCAGAACGACTATAGCTACCCCTTCACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAG CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTC ACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT AAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC

NEG0064		
SEQ ID NO: 81	HCDR1 (Kabat)	DHTLH
SEQ ID NO: 82	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSTKYNENFRG
SEQ ID NO: 83	HCDR3 (Kabat)	RLLFLPLDY
SEQ ID NO: 84	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH
SEQ ID NO: 85	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS
SEQ ID NO: 86	HCDR3 (Chothia)	RLLFLPLDY
SEQ ID NO: 87	VH	QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKVSGYTFTDHTLHWMRQ APGQGLEWMGYIYPRSGSTKYNENFRGRVTITADTSSST AYMELSSLRSEDTAVYYCVRRLLFLPLDYWGQGTLVTVS S
SEQ ID NO: 88	VH de ADN	

NEG0064		
		<p>CAGATTCAGCTGGTGACAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAA CCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTCTCAGGC TACACCTTCACCGATCACACCCTGCACTGGATGAGACAG GCCCCAGGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTAC CCTAGATCAGGCTCTACTAAGTATAACGAGAACTTTAGG GGTAAGTACTATCACCGCCGACACTAGCTCTAGCACC GCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACC GCCGTCTACTACTGCGTCAGACGGCTGCTGTTCTGCCC CTGGACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCT AGC</p>
SEQ ID NO: 89	Cadena pesada	<p>QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKVSGYTFDHTLHWMRQ APGQGLEWMGYIYPRSGSTKYNNFRGRVTITADTSSST AYMELSSLRSEDVAVYYCVRRLFLPLDYWGQGLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ</p>
		<p>DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
SEQ ID NO: 90	Cadena pesada de ADN	

NEG0064		
		CAGATTCAGCTGGTGAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAA CCCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTCTCAGGC TACACCTTCACCGATCACACCCTGCACTGGATGAGACAG GCCCCAGGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTAC CCTAGATCAGGCTCTACTAAGTATAACGAGAACTTTAGG GGTAGAGTGACTATCACCGCCGACACTAGCTCTAGCACC GCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACC GCCGTCTACTACTGCGTCAGACGGCTGCTGTTCTGCCC CTGGACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCT AGCGCTAGCACTAAGGGCCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAACTGCTGCCCTG GGTTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACA GTGTCCTGGAAGTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGAC ACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCTGTACAGC CTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGA ACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCCAAGAGCTGC GACAAGACCCACACCTGCCCCCCCCCTGCCAGCTCCAGAA CTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCCCCAAG CCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCACGAGGACCCAGAG GTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC AACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGC ACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAAGTCTCC AACAAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGAT ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAAAC AACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGC AGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC AGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTGAGCTGCAGCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCCTACACCCAGAAGTCCCTG AGCCTGAGCCCCGGCAAG
SEQ ID NO: 91	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLLSSGNQKSYLT
SEQ ID NO: 92	LCDR2 (Kabat)	WASTRES
SEQ ID NO: 93	LCDR3 (Kabat)	QNDYSYPFT
SEQ ID NO: 94	LCDR1 (Chothia)	SQSLLSSGNQKSY
SEQ ID NO: 95	LCDR2 (Chothia)	WAS
SEQ ID NO: 96	LCDR3 (Chothia)	DYSYPF
SEQ ID NO: 97	VL	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSLLSSGNQKSYL TWYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSDFT LTISSLQPEDFAVYYCQNDYSYPFTFGQGTKLEIK
SEQ ID NO: 98	VL de ADN	

NEG0064		
		GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCCTG AGCCCTGGCGAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGATCTAGT CAGTCACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGTCCTACCTG ACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAGGCCCTAGACTG CTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATCCCC GCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACC CTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTC TACTACTGTCAGAACGACTATAGCTACCCCTTCACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATTAAG
SEQ ID NO: 99	Cadena ligera	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSLSSGNQKSYL TWYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSDFT LTISSLQPEDFAVYYCQNDYSYPFTFGQGTKLEIKRTVA APSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 100	Cadena ligera de ADN	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCCTG AGCCCTGGCGAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGATCTAGT CAGTCACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGTCCTACCTG ACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAGGCCCTAGACTG CTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATCCCC GCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACCGACTTCACC CTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCGTC TACTACTGTCAGAACGACTATAGCTACCCCTTCACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCC GCTCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCCAGCGACGAGCAG CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTC ACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT AAGGTGTACGCCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC
NEG0067		
SEQ ID NO: 101	HCDR1 (Kabat)	DHTLH
SEQ ID NO: 102	HCDR2 (Kabat)	YIYPRSGSTKYNENFKG
SEQ ID NO: 103	HCDR3 (Kabat)	RLLFLPLDY
SEQ ID NO: 104	HCDR1 (Chothia)	GYTFTDH
SEQ ID NO: 105	HCDR2 (Chothia)	YPRSGS
SEQ ID NO: 106	HCDR3 (Chothia)	RLLFLPLDY
SEQ ID NO: 107	VH	

NEG0064		
		<p>QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKVSGYTFTDHTLHWMRQ APGQGLEWMGYIYPRSGSTKYNNENFKGRVTITADTSSST AYMELSSLRSEDYAVYYCVRRLLEFLPLDYWGQGTLLTVS S</p>
SEQ ID NO: 108	VH de ADN	<p>CAGATTCAGCTGGTGCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAA CCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTCTCAGGC TACACCTTCACCGATCACACCTGCACTGGATGAGACAG GCCCCAGGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTAC CCTAGATCAGGCTCTACTAAGTATAACGAGAAGTTTAAG GGTAGAGTGACTATCACCGCCGACACTAGCTCTAGCACC GCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACC GCCGTCTACTACTGCGTCAGACGGCTGCTGTTTCCTGCCC CTGGACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCT AGC</p>
SEQ ID NO: 109	Cadena pesada	<p>QIQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKVSGYTFTDHTLHWMRQ APGQGLEWMGYIYPRSGSTKYNNENFKGRVTITADTSSST AYMELSSLRSEDYAVYYCVRRLLEFLPLDYWGQGTLLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
SEQ ID NO: 110	Cadena pesada de ADN	

NEG0064		
		<p>CAGATTTCAGCTGGTGTCAGTCAGGCGCCGAAGTGAAGAAA CCCGGCTCTAGCGTGAAAGTCAGCTGTAAAGTCTCAGGC TACACCTTCACCGATCACACCCTGCACTGGATGAGACAG GCCCCAGGTCAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTATATCTAC CCTAGATCAGGCTCTACTAAGTATAACGAGAAGTTTAAG GGTAAGTGAATATCACCGCCGACACTAGCTCTAGCACC GCCTATATGGAAGTGTCTAGCCTGAGATCAGAGGACACC GCGTCTACTACTGCGTCAGACGGCTGCTGTTCCCTGCCC CTGGACTACTGGGGTCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCT AGCGCTAGCACTAAGGGCCCCAAGTGTGTTTCCCCTGGCC CCCAGCAGCAAGTCTACTTCCGGCGGAAGTGTGCCCCTG GGTGCGTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACA GTGTCCTGGAAGTCTGGGGCTCTGACTTCCGGCGTGAC ACCTTCCCCGCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGC CTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGA ACCCAGACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCCAAGAGCTGC GACAAGACCCACACCTGCCCCCCCCCTGCCAGCTCCAGAA CTGCTGGGAGGGCCTTCCGTGTTCTGTTCCCCCCCCAAG CCCAAGGACACCCCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTG ACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCACGAGGACCCAGAG GTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAC AACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGC</p>
		<p>ACCTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAAGAATAACAAGTGCAAAGTCTCC AACAAGGCCCTGCCAGCCCCAATCGAAAAGACAATCAGC AAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACC CTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTG TCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGAT ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCAGAAC AACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGACGGC AGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC AGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTG AGCCTGAGCCCCGGCAAG</p>
SEQ ID NO: 111	LCDR1 (Kabat)	RSSQSLSSGNQKSYLT
SEQ ID NO: 112	LCDR2 (Kabat)	WASTRES
SEQ ID NO: 113	LCDR3 (Kabat)	QNDYSPFT
SEQ ID NO: 114	LCDR1 (Chothia)	SQSLSSGNQKSY
SEQ ID NO: 115	LCDR2 (Chothia)	WAS
SEQ ID NO: 116	LCDR3 (Chothia)	DYSPF
SEQ ID NO: 117	VL	<p>EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSLSSGNQKSYL TWYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSDFT LTISSLQPEDFAVYYCQNDYSPFTFGQGKLEIK</p>

NEG0064		
SEQ ID NO: 118	VL de ADN	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCCTG AGCCCTGGCGAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGATCTAGT CAGTCACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGTCCTACCTG ACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAGGCCCTAGACTG CTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATCCCC GCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACC GACTTCACC CTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCGTC TACTACTGTCAGAACGACTATAGCTACCCCTTCACCTTC GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATTAAG
SEQ ID NO: 119	Cadena ligera	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSQSLSSGNQKSYL TWYQQKPGQAPRLLIYWASTRESGIPARFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFAVYYCQNDYSYPFTFGQGTKLEIKRTVA APSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 120	Cadena ligera de ADN	GAGATCGTGATGACTCAGTCACCCGCTACCCTGAGCCTG AGCCCTGGCGAGAGAGCTACACTGAGCTGTAGATCTAGT CAGTCACTGCTGTCTAGCGGTAATCAGAAGTCCTACCTG ACCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGTCAGGCCCTAGACTG CTGATCTACTGGGCCTCTACTAGAGAGTCAGGGATCCCC GCTAGGTTTAGCGGTAGCGGTAGTGGCACC GACTTCACC CTGACTATCTCTAGCCTGCAGCCCCGAGGACTTCGCCGTC TACTACTGTCAGAACGACTATAGCTACCCCTTCACCTTC
		GGTCAGGGCACTAAGCTGGAGATTAAGCGTACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAG CTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAAC AACTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTC ACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGC AGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCAT AAGGTGTACGCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC

5

Otros anticuerpos de la divulgación incluyen aquellos donde los aminoácidos o ácidos nucleicos que codifican los aminoácidos se han mutados, pero tienen al menos un 60, 70, 80, 90 o 95 por ciento de identidad con las secuencias descritas en la tabla 1. En algunas realizaciones, se han mutado 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en las regiones variables en comparación con las regiones variables representadas en la secuencia descrita en la tabla 1, a la vez que conservan sustancialmente la misma actividad terapéutica que los anticuerpos enumerados en la tabla 1.

Ya que cada uno de estos anticuerpos se puede unir a P-cadherina, las secuencias de VH, VL, de la cadena ligera de longitud completa y de la cadena pesada de longitud completa (secuencias de aminoácidos y secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos) se pueden "combinar" para crear otros anticuerpos que se unen a P-cadherina. Dichos anticuerpos de unión a P-cadherina "combinados" pueden probarse usando los ensayos de unión conocidos en la técnica (p. ej., ELISA y otros ensayos descritos en la sección de ejemplos). Cuando estas cadenas se combinan, una secuencia de VH de un emparejamiento VH/VL particular se debe reemplazar con una secuencia de VH estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia de cadena pesada de longitud completa de un emparejamiento de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa particular debe reemplazarse con una secuencia de cadena pesada de longitud completa estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia de VL de un emparejamiento VH/VL particular debe reemplazarse con una secuencia de VL estructuralmente similar. Asimismo, una secuencia de cadena ligera de longitud completa de un emparejamiento de cadena pesada de longitud completa/cadena ligera de longitud completa particular debe reemplazarse con una secuencia de cadena ligera de longitud completa estructuralmente similar. Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una región de unión a antígeno del mismo que tiene: una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17; en donde el anticuerpo se une específicamente a P-cadherina.

En otro aspecto, la invención proporciona (i) un anticuerpo monoclonal aislado que tiene: una cadena pesada de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 que se ha optimizado para su expresión en la célula de un sistema de expresión de mamífero; y una cadena ligera de longitud completa que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 que se ha optimizado para su expresión en la célula de un sistema de expresión de mamífero; o (ii) una proteína funcional que comprende una parte de unión a antígeno de la misma.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos de unión a P-cadherina que comprenden las CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y cadena ligera, como se ha descrito en la tabla 1, o combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 1, 21, 41, 61, 81 y 101. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 2, 22, 42, 62, 82 y 102. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de VH de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 3, 23, 43, 63, 83 y 103. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1 de VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 11, 31, 51, 71, 91 y 111. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2 de VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 12, 32, 52, 72, 92 y 112. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3 de VL de los anticuerpos se muestran en las SEQ ID NO: 13, 33, 53, 73, 93 y 113.

Ya que cada uno de estos anticuerpos puede unirse a P-cadherina y que la especificidad de unión a antígeno es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, 2 y 3, las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de VH y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de VL pueden "combinarse" (es decir, se pueden combinar CDR de diferentes anticuerpos). Dichos anticuerpos de unión a P-cadherina "combinados" se pueden analizar utilizando los ensayos de unión conocidos en la técnica y los descritos en los ejemplos (p. ej., ELISA). Cuando las secuencias de CDR de VH se combinan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de VH particular se debe reemplazar con una o más secuencias de CDR estructuralmente similares. Asimismo, cuando las secuencias de CDR de VL se combinan, la secuencia de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia de VL particular debe reemplazarse con una o más secuencias de CDR estructuralmente similares. Será muy evidente para los expertos en la materia que pueden crearse secuencias de VH y VL novedosas sustituyendo una o más secuencias de la región CDR de VH y/o VL con secuencias estructuralmente similares de las secuencias de CDR mostradas en el presente documento para anticuerpos monoclonales de la presente invención.

En una realización específica según la invención, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se une específicamente a P-cadherina comprende una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2; una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3; una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 11; una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 12; y una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 13.

En determinadas realizaciones de la divulgación, un anticuerpo que se une específicamente a P-cadherina es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (p. ej., fragmento de unión a antígeno) que se describe en la tabla 1.

1. Identificación de epítomos y anticuerpos que se unen al mismo epítopo

En el presente documento se desvelan anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente a un epítopo de la P-cadherina humana que comprende uno o más restos seleccionados de los aminoácidos en las posiciones 124, 125, 151, 153, 154, 155, 156, 159, 160, 161, 162, 163, 168, 170, 171 y 172 de la SEQ ID NO: 126. Además se desvelan en el presente documento anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que comprenden una cadena pesada que se une a P-cadherina humana en uno o más restos de aminoácidos seleccionados de las posiciones 124, 151, 153-156 y 172 de la SEQ ID NO: 126. También se desvelan anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que comprenden una cadena ligera que se une a P-cadherina humana en uno o más restos de aminoácidos seleccionados de las posiciones 124, 125, 155, 156, 159-163, 168, 170 y 171 de la SEQ ID NO: 126. En algunas realizaciones de la divulgación, los anticuerpos o

fragmentos de anticuerpos comprenden un parátipo de unión a cadena pesada para la proteína P-cadherina humana que comprende uno o más restos de aminoácidos seleccionados de las posiciones 52, 54, 56, 60, 65, 105 o 107 de la SEQ ID NO: 128. En otras realizaciones de la divulgación, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos comprenden un parátipo de unión a cadena ligera para la proteína P-cadherina humana que comprende uno o más restos de aminoácidos seleccionados de las posiciones 1, 2, 27, 28, 30, 68, 92, 93 o 94 de la SEQ ID NO: 129

En el presente documento se desvelan anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) que se unen específicamente al mismo epítipo que los anticuerpos anti-P-cadherina descritos en la tabla 1 o compiten de forma cruzada con los anticuerpos descritos en la tabla 1. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos adicionales (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) pueden por lo tanto identificarse en función de su capacidad de competencia cruzada (p. ej., para inhibir competitivamente la unión, de una manera estadísticamente significativa) con otros anticuerpos de la invención en ensayos de unión de P-cadherina, por ejemplo, mediante BIACORE o ensayos conocidos por los expertos en la materia para medir la unión. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) a una P-cadherina (p. ej., P-cadherina humana) demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con ese anticuerpo o fragmento de anticuerpo (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) por la unión a la P-cadherina; dicho anticuerpo puede, según una teoría no limitante, unirse al mismo epítipo o a uno relacionado (p. ej., uno estructuralmente similar o espacialmente próximo o solapante) en la proteína P-cadherina que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) contra el que compete. En determinadas realizaciones de la divulgación, los anticuerpos que se unen al mismo epítipo en P-cadherina que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) descritos en la tabla 1 son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Dichos anticuerpos monoclonales humanos o humanizados pueden prepararse y aislarse como se describe en el presente documento.

2. Alteración adicional del marco de la región Fc

Los inmunoconjugados de la invención pueden comprender anticuerpos modificados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden además modificaciones de los restos de marco en VH y/o VL, p. ej., para mejorar las propiedades del anticuerpo. En algunas realizaciones, las modificaciones del marco se realizan para disminuir la inmunogenicidad de un anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en "retromutar" uno o más restos del marco a la secuencia de la estirpe germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado una mutación somática puede contener restos del marco que difieren de la secuencia de la estirpe germinal de la que deriva el anticuerpo. Dichos restos pueden identificarse comparando las secuencias del marco del anticuerpo con las secuencias de la estirpe germinal de las que deriva el anticuerpo. Para devolver las secuencias de la región marco a su configuración de la estirpe germinal, las mutaciones somáticas pueden "retromutarse" a la secuencia de la estirpe germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida. También se entiende que dichos anticuerpos "retromutados" están abarcados por la invención.

Otro tipo de modificación del marco implica la mutación de uno o más restos dentro de la región marco, o incluso dentro de una o más regiones CDR, para eliminar los epítopos de los linfocitos T y reducir de este modo la posible inmunogenicidad del anticuerpo. Este enfoque también se denomina "desinmunización" y se describe con más detalle en la publicación de patente de los EE. UU. n.º 20030153043 de Carr *et al.*

Además o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro de las regiones marco o CDR, los anticuerpos de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para que incluyan modificaciones dentro de la región Fc, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc y/o la citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Adicionalmente, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (p. ej., pueden fijarse una o más porciones químicas al anticuerpo) o modificarse para alterar su glucosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con mayor detalle a continuación.

En una realización, la región de bisagra de CH1 se modifica de manera que el número de restos de cisteína en la región de bisagra se altere, p. ej., aumente o disminuya. Este enfoque se describe adicionalmente en la patente de los EE. UU. n.º 5.677.425 de Bodmer *et al.* El número de restos de cisteína en la región de bisagra de CH1 se altera, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región de bisagra de Fc de un anticuerpo se muta para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento de bisagra Fc de manera que el anticuerpo tenga una alteración de la unión de proteína A estafilocócica (SpA) con respecto a la unión de SpA del dominio de bisagra Fc nativo. Este enfoque se describe con más detalle en la patente de los EE. UU. n.º 6.165.745 de Ward *et al.*

En otras realizaciones más, la región Fc se altera reemplazando al menos un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos pueden reemplazarse por un resto de aminoácido diferente, de tal manera que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector, pero conserve la capacidad de unión a antígeno del anticuerpo precursor. El ligando efector cuya afinidad

de altera puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe, p. ej., en las patentes de los EE. UU. n.º 5.624.821 y 5.648.260, ambas de Winter *et al.*

En otra realización, pueden remplazarse uno o más aminoácidos seleccionados de restos de aminoácidos por un resto de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tenga una unión a C1q alterada y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o anulada. Este enfoque se describe, p. ej., en la patente de los EE.UU. n.º 6.194.551 de Idusogie *et al.*

En otra realización, se alteran uno o más restos de aminoácidos para alterar de este modo la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe, p. ej., en la publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer *et al.* En una realización específica, uno o más aminoácidos de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de la presente invención se reemplazan por uno o más restos de aminoácidos alotípicos, tales como los que se muestran en la figura 4 para la subclase IgG1 y el isotipo kappa. Los restos de aminoácidos alotípicos también incluyen, pero sin limitación, la región constante de la cadena pesada de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3, así como la región constante de la cadena ligera del isotipo kappa como describen Jefferis *et al.*, *MAbs*. 1:332-338 (2009).

En otra realización más, la región Fc se modifica para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fcγ modificando uno o más aminoácidos. Este enfoque se describe, p. ej., en la publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, se han cartografiado los sitios de unión en IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn y se han descrito variantes con unión mejorada (véase Shields *et al.*, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604, 2001).

En otra realización más, se modifica la glucosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, se puede hacer un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el "antígeno". Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que den lugar a la eliminación de uno o más sitios de glucosilación del marco de la región variable para eliminar de este modo la glucosilación en ese sitio. Una aglucosilación de este tipo puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Se describe un enfoque de este tipo, p. ej., en las patentes de los EE. UU. n.º 5.714.350 y 6.350.861, de Co *et al.*

Adicionalmente o como alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glucosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo que tenga un aumento de estructuras de GlcNac bisecantes. Se ha demostrado que dichos patrones de glucosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Pueden lograrse modificaciones de carbohidratos de este tipo, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada. Se han descrito en la técnica células con una maquinaria de glucosilación alterada y pueden usarse como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de esta manera un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 de Hang *et al.* describe una estirpe celular con un gen de FUT8 funcionalmente alterado, que codifica una fucosil transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en dicha estirpe celular presenten hipofucosilación. La publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una estirpe celular CHO variante, células Lec3, con capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos ligados a Asn(297), lo que también da lugar a la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields *et al.*, (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). En la publicación PCT WO 99/54342 de Umana *et al.* se describen estirpes celulares diseñadas para expresar glucosil transferasas modificadoras de glucoproteínas (p. ej., beta (1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de modo que los anticuerpos expresados en las estirpes celulares modificadas presentan más estructuras de GlcNac bisecantes, lo que da lugar a una mayor actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umana *et al.*, *Nat. Biotech.* 17:176-180, 1999).

En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, pueden introducirse una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describen en la patente de los EE. UU. n.º 6.277.375 de Ward. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para que contenga una epitopo de unión a receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las patentes de los EE. UU. n.º 5.869.046 y 6.121.022 de Presta *et al.*

3. Producción de anticuerpos contra P-cadherina

Los anticuerpos anti-P-cadherina y fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) de los mismos pueden producirse por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, expresión recombinante, síntesis química y digestión enzimática de tetrámeros de anticuerpos, mientras que los anticuerpos monoclonales de longitud completa pueden obtenerse mediante, p. ej., hibridoma o producción recombinante. La expresión recombinante puede ser a partir de cualquier célula hospedadora adecuada conocida en la técnica, por ejemplo, células hospedadoras de mamífero, células hospedadoras bacterianas, células hospedadoras de levadura, células hospedadoras de insecto, etc.

La invención proporciona además polinucleótidos que codifican los anticuerpos descritos en el presente documento, p. ej., polinucleótidos que codifican regiones variables de cadena ligera o pesada o segmentos que comprenden las regiones determinantes de la complementariedad como se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica las regiones variables de cadena pesada tiene al menos un 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica las regiones variables de cadena ligera tiene al menos un 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con la SEQ ID NO: 18.

En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica la cadena pesada tiene al menos un 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con la SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, el polinucleótido que codifica la cadena ligera tiene al menos un 85 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con la SEQ ID NO: 20,

Los polinucleótidos de la invención pueden codificar solo la secuencia de la región variable de un anticuerpo anti-P-cadherina de la invención. También pueden codificar tanto una región variable como una región constante del anticuerpo. Algunas de las secuencias polinucleotídicas codifican un polipéptido que comprende regiones variables tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera de un anticuerpo de ratón anti-P-cadherina ilustrativo. Algunos otros polinucleótidos codifican dos segmentos polipeptídicos que son respectivamente sustancialmente idénticos a las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de uno de los anticuerpos de ratón.

Las secuencias polinucleotídicas pueden producirse por síntesis de ADN *de novo* en fase sólida o por mutagénesis por PCR de una secuencia existente (p. ej., las secuencias descritas en los ejemplos a continuación) que codifica un anticuerpo anti-P-cadherina o su fragmento de unión. La síntesis química directa de ácidos nucleicos se puede lograr mediante métodos conocidos en la técnica, tales como el método de fosfotriéster de Narang *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68:90, 1979; el método de fosfodiéster de Brown *et al.*, *Meth. Enzymol.* 68:109, 1979; el método de dietilfosforoamidita de Beaucage *et al.*, *Tetra. Lett.*, 22:1859, 1981; y el método de soporte sólido de la patente de los EE. UU. n.º 4.458.066. La introducción de mutaciones en una secuencia polinucleotídica mediante PCR se puede realizar como se describe, p. ej., en *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis *et al.* (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 19:967, 1991; y Eckert *et al.*, *PCR Methods and Applications* 1:17, 1991.

También se proporcionan en la invención vectores de expresión y células hospedadoras para producir los anticuerpos anti-P-cadherina de la invención descritos anteriormente. Se pueden emplear diversos vectores de expresión para expresar los polinucleótidos que codifican las cadenas de anticuerpos anti-P-cadherina o los fragmentos de unión. Se pueden usar vectores de expresión basados en virus y no víricos para producir los anticuerpos en una célula hospedadora de mamífero. Los vectores y sistemas no víricos incluyen plásmidos, vectores episómicos, normalmente con un casete de expresión para expresar una proteína o ARN, y cromosomas artificiales humanos (véase, p. ej., Harrington *et al.*, *Nat Genet* 15: 345, 1997). Por ejemplo, los vectores no víricos útiles para la expresión de los polinucleótidos y polipéptidos anti-P-cadherina en células de mamíferos (p. ej., humanas) incluyen pThioHis A, B y C, pcDNA™3.1/His, pEBVHis A, B y C, (Invitrogen, San Diego, CA), vectores MPSV y numerosos otros vectores conocidos en la técnica para expresar otras proteínas. Los vectores víricos útiles incluyen vectores basados en retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus, vectores basados en SV40, virus del papiloma, virus de Epstein Barr HBP, vectores del virus variolovacunal y virus del bosque de Semliki (SFV). Véase, Brent *et al.*, citado anteriormente; Smith, *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 807, 1995; y Rosenfeld *et al.*, *Cell* 68: 143, 1992.

La elección del vector de expresión depende de las células hospedadoras en las que se prevé que se exprese el vector. Normalmente, los vectores de expresión contienen un promotor y otras secuencias reguladoras (p. ej., potenciadores) que están unidas operativamente a los polinucleótidos que codifican una cadena o un fragmento de un anticuerpo anti-P-cadherina. En algunas realizaciones, se emplea un promotor inducible para evitar la expresión de secuencias insertadas excepto en condiciones inductoras. Los promotores inducibles incluyen, p. ej., arabinosa, lacZ, promotor de metalotioneína o un promotor de choque térmico. Los cultivos de organismos transformados se pueden expandir en condiciones no inductoras sin sesgar la población en favor de secuencias codificantes cuyos productos de expresión son mejor tolerados por las células hospedadoras. Además de los promotores, también se pueden requerir o desear otros elementos reguladores para la expresión eficaz de una cadena o fragmento de anticuerpo anti-P-cadherina. Estos elementos normalmente incluyen un codón de iniciación ATG y un sitio de unión al ribosoma adyacente u otras secuencias. Además, la eficiencia de expresión puede potenciarse mediante la inclusión de potenciadores adecuados para el sistema celular en uso (véase, p. ej., Scharf *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 20:125, 1994; y Bittner *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 153:516, 1987). Por ejemplo, puede utilizarse el potenciador de SV40 o el potenciador de CMV para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamífero.

Los vectores de expresión también pueden proporcionar una posición de secuencia de señal de secreción para formar una proteína de fusión con polipéptidos codificados por secuencias de anticuerpos anti-P-cadherina. Más a menudo, las

secuencias de anticuerpos anti-P-cadherina insertadas se unen a secuencias señal antes de su inclusión en el vector. Los vectores que se van a usar para recibir secuencias que codifican dominios variables de cadena ligera y pesada de anticuerpos anti-P-cadherina a veces también codifican regiones constantes o partes de las mismas. Dichos vectores permiten la expresión de las regiones variables como proteínas de fusión con las regiones constantes, conduciendo de este modo a la producción de anticuerpos intactos o fragmentos de los mismos. Normalmente, dichas regiones constantes son humanas.

Las células hospedadoras para albergar y expresar las cadenas de anticuerpos anti-P-cadherina pueden ser procariotas o eucariotas. La *E. coli* es un hospedador procariota útil para clonar y expresar los polinucleótidos de la presente invención. Otros hospedadores microbianos adecuados para usar incluyen bacilos, tales como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacterias, tales como *Salmonella*, *Serratia* y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos hospedadores procariotas, también se pueden preparar vectores de expresión, que contienen habitualmente secuencias de control de la expresión compatibles con la célula hospedadora (p. ej., un origen de replicación). Además, estará presente cualquiera de diversos promotores bien conocidos, tales como el sistema promotor de lactosa, un sistema promotor de triptófano (trp), un sistema promotor de beta-lactamasa o un sistema promotor del fago lambda. Los promotores controlan normalmente la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias de sitios de unión a ribosomas y similares, para iniciar y completar la transcripción y la traducción. También pueden emplearse otros microbios, tales como levadura, para expresar los polipéptidos anti-P-cadherina de la invención. También se pueden usar células de insecto en combinación con vectores de baculovirus.

En algunas realizaciones preferidas, se usan células hospedadoras de mamífero para expresar y producir los polipéptidos anti-P-cadherina de la presente invención. Por ejemplo, pueden ser una estirpe celular de hibridoma que exprese genes de inmunoglobulina endógenos (p. ej., los clones de hibridoma de mieloma como se describen en los ejemplos) o una estirpe celular de mamífero que alberga un vector de expresión exógeno (p. ej., las células de mieloma SP2/0 ilustradas a continuación). Estas incluyen cualquier célula humana o animal mortal normal o inmortal normal o anómala. Por ejemplo, se han desarrollado varias estirpes celulares hospedadoras adecuadas capaces de secretar inmunoglobulinas intactas, incluidas las estirpes celulares CHO, diversas estirpes celulares Cos, células HeLa, estirpes celulares de mieloma, linfocitos B transformados e hibridomas. El uso del cultivo celular de tejidos de mamíferos para expresar polipéptidos se analiza en general en, p. ej., Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Los vectores de expresión para células hospedadoras de mamíferos pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor y un potenciador (véase, p. ej., Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89: 49-68, 1986), y los sitios de información de procesamiento necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Estos vectores de expresión contienen habitualmente promotores derivados de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos, específicos del tipo celular, específicos de fase y/o modulables o regulables. Los promotores útiles incluyen, pero sin limitación, el promotor de la metalotioneína, el promotor tardío principal constitutivo de adenovirus, el promotor inducible por dexametasona de MMTV, el promotor de SV40, el promotor de polIII de MRP, el promotor constitutivo de MPSV, el promotor inducible por tetraciclina de CMV (tal como el promotor temprano inmediato del CMV humano), el promotor constitutivo de CMV y combinaciones de promotor-potenciador conocidas en la técnica.

Los métodos para introducir vectores de expresión que contengan las secuencias polinucleotídicas de interés varían dependiendo del tipo de hospedador celular. Por ejemplo, la transfección con cloruro de calcio se utiliza habitualmente para las células procariotas, mientras que el tratamiento con fosfato de calcio o la electroporación se pueden utilizar para otros hospedadores celulares (véase en general Sambrook *et al.*, citado anteriormente). Otros métodos incluyen, p. ej., electroporación, tratamiento con fosfato de calcio, transformación mediada por liposomas, inyección y microinyección, métodos balísticos, virosomas, inmunoliposomas, conjugados de polimerización:ácido nucleico, ADN desnudo, viriones artificiales, fusión a la proteína estructural VP22 del virus del herpes (Elliot y O'Hare, *Cell* 88:223, 1997), captación potenciada por agente de ADN y transducción *ex vivo*. Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, a menudo se deseará una expresión estable. Por ejemplo, pueden prepararse estirpes celulares que expresen de forma estable cadenas o fragmentos de unión de anticuerpos de unión anti-P-cadherina utilizando vectores de expresión de la invención que contengan orígenes víricos de replicación o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. Después de la introducción del vector, se puede permitir que las células se propaguen durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiar al medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección y su presencia permite la multiplicación de células que expresan con éxito las secuencias introducidas en medios selectivos. Las células resistentes, transfectadas de forma estable, pueden proliferar utilizando técnicas de cultivo tisular adecuadas para el tipo celular.

Usos terapéuticos y diagnósticos

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) y conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención son útiles en diversas aplicaciones que incluyen, pero sin limitación, el tratamiento del cáncer, tal como cánceres sólidos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) y conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención son útiles para inhibir el crecimiento tumoral, inducir la diferenciación, reducir el volumen tumoral y/o reducir la tumorigenicidad de un tumor. Los métodos de uso pueden ser métodos *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*.

En un aspecto, los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) y los conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención son útiles para detectar la presencia de P-cadherina en una muestra biológica. El término "detección", como se utiliza en el presente documento, abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En determinadas realizaciones, una muestra biológica comprende una célula o tejido. En determinadas realizaciones, dichos tejidos incluyen tejidos normales y/o cancerosos que expresan P-cadherina en niveles más altos en relación con otros tejidos.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para detectar la presencia de P-cadherina en una muestra biológica. En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-P-cadherina en condiciones que permitan la unión del anticuerpo al antígeno y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo y el antígeno.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método para diagnosticar un trastorno asociado con el aumento de la expresión de P-cadherina. En determinadas realizaciones, el método comprende poner en contacto una célula de prueba con un anticuerpo anti-P-cadherina; determinar el nivel de expresión (de forma cuantitativa o cualitativa) de P-cadherina en la célula de prueba detectando la unión del anticuerpo anti-P-cadherina al antígeno de P-cadherina; y comparar el nivel de expresión de P-cadherina en la célula de prueba con el nivel de expresión de P-cadherina en una célula de control (p. ej., una célula normal del mismo origen tisular que la célula de prueba o una célula que expresa P-cadherina a niveles comparables a dicha célula normal), en donde un mayor nivel de expresión de P-cadherina en la célula de prueba en comparación con la célula de control indica la presencia de un trastorno asociado con una mayor expresión de P-cadherina. En determinadas realizaciones, la célula de prueba se obtiene de un individuo del que se sospecha que tiene un trastorno asociado con una mayor expresión de P-cadherina. En determinadas realizaciones, el trastorno es un trastorno de proliferación celular, tal como un cáncer o un tumor. En determinadas realizaciones, el método comprende medir el número de copias del gen de P-cadherina en una célula de prueba. En determinadas realizaciones, el método comprende detectar una mutación por translocación PAX-FOXO. El número de copias de un gen y/o mutaciones por translocación se pueden detectar usando métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, PCR, RTPCR, etc.

En determinadas realizaciones, un método de diagnóstico o detección, tal como los descritos anteriormente, comprende detectar la unión de un anticuerpo anti-P-cadherina a P-cadherina expresada en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que expresa P-cadherina en su superficie. Un ensayo ilustrativo para detectar la unión de un anticuerpo anti-P-cadherina a P-cadherina expresada en la superficie de una célula es un ensayo "FACS".

Se pueden utilizar otros métodos determinados para detectar la unión de anticuerpos anti-P-cadherina a P-cadherina. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, ensayos de unión a antígeno que son bien conocidos en la técnica, tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A e inmunohistoquímica (IHC).

En determinadas realizaciones, se marcan anticuerpos anti-P-cadherina. Los marcadores incluyen, pero sin limitación, marcadores o porciones que se detectan directamente (tales como marcadores fluorescentes, cromóforos, electrodenso, quimioluminiscentes y radiactivos), así como porciones, tales como enzimas o ligandos, que se detectan indirectamente, p. ej., mediante una reacción enzimática o interacción molecular.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-P-cadherina se inmovilizan en una matriz insoluble. La inmovilización implica separar el anticuerpo anti-P-cadherina de cualquier proteína P-cadherina que quede libre en solución. Esto se logra convencionalmente ya sea insolubilizando el anticuerpo anti-P-cadherina antes del procedimiento de ensayo o mediante adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich *et al*, patente de los EE. UU. n.º 3.720.760), o mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, usando reticulación con glutaraldehído), o insolubilizando el anticuerpo anti-P-cadherina después de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-P-cadherina y la proteína P-cadherina, p. ej., mediante inmunoprecipitación.

Cualquiera de las realizaciones anteriores de diagnóstico o detección se puede llevar a cabo usando un inmunoconjugado de la invención en lugar de o además de un anticuerpo anti-P-cadherina.

En una realización, la divulgación proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad que comprende administrar los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención a un paciente. La divulgación también proporciona el uso de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno o conjugados de fármacos y anticuerpos de la invención para tratar o prevenir una enfermedad en un paciente. En algunas realizaciones, la invención proporciona anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno o conjugados de fármacos y anticuerpos de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad en un paciente. En realizaciones adicionales, la divulgación proporciona el uso de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno o

conjugados de fármacos y anticuerpos de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad en un paciente.

En determinadas realizaciones, la enfermedad tratada con los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) y conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención es un cáncer. En determinadas realizaciones, el cáncer se caracteriza por células que expresan P-cadherina a las que se unen los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) y conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención. En determinadas realizaciones, el cáncer se caracteriza por un aumento de la expresión de P-cadherina en relación con un paciente sano. En algunas realizaciones, la expresión de P-cadherina se puede medir mediante un aumento en el ARN de P-cadherina. En otras realizaciones, el cáncer se caracteriza por un aumento del número de copias de ADN de P-cadherina. Los expertos en la técnica conocen otros métodos para medir o determinar los niveles de expresión de P-cadherina. Los ejemplos de enfermedades que pueden tratarse y/o prevenirse incluyen, pero sin limitación, carcinoma adrenocortical, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de mama, teratomas/tumores rabdoides atípicos del sistema nervioso central, cáncer de colon, cáncer colorrectal, tumores embrionarios, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, sarcoma de Kaposi, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, incluido el cáncer microcítico de pulmón y el cáncer no microcítico de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de recto, rabdomiosarcoma, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer escamoso de cuello, cáncer de estómago, cáncer de útero, cáncer de vagina y cáncer de vulva.

La presente divulgación proporciona métodos para tratar el cáncer que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer sólido. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer resistente y/o un cáncer recidivante. En determinados aspectos, por ejemplo, el cáncer resistente es resistente a inhibidores de tirosina cinasa, incluidos, pero sin limitación, inhibidores de EGFR, inhibidores de Her2, inhibidores de Her3, inhibidores de IGFR e inhibidores de Met. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer resistente a Her2.

En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona métodos para inhibir el crecimiento tumoral que comprenden administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene un tumor o se le ha extirpado un tumor. En determinadas realizaciones, el tumor es resistente a otros inhibidores de la tirosina cinasa, incluidos, pero sin limitación, inhibidores de EGFR, inhibidores de Her2, inhibidores de Her3, inhibidores de IGFR e inhibidores de Met.

En determinadas realizaciones, el tumor expresa la P-cadherina a la que se une el anticuerpo anti-P-cadherina. En determinadas realizaciones de la divulgación, el tumor sobreexpresa la P-cadherina humana. En determinadas realizaciones de la divulgación, el tumor tiene un mayor número de copias del gen de la P-cadherina.

La presente divulgación también proporciona métodos para seleccionar a pacientes para su tratamiento con anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dichos anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o conjugados de anticuerpos y fármacos. En determinados aspectos, el método comprende seleccionar a pacientes con un cáncer resistente a inhibidores de la tirosina cinasa. En determinados aspectos se contempla que el cáncer resistente a inhibidores de la tirosina cinasa es resistente a inhibidores de EGFR, inhibidores de Her2, inhibidores de Her3, inhibidores de IGFR y/o inhibidores de Met. En determinados aspectos, se contempla que el cáncer resistente es un cáncer resistente a Her2. Más específicamente se contempla que el cáncer resistente a Her2 no responde a trastuzumab o trastuzumab emtansina. En determinados aspectos se contempla que el cáncer es un cáncer resistente *de novo* y en otros aspectos más se contempla que el cáncer es un cáncer recidivante, por ejemplo, un cáncer Her2 recidivante. En determinados aspectos, los métodos comprenden seleccionar a un paciente con un cáncer resistente *de novo* o recidivante y medir la expresión de P-cadherina. Se contempla que en determinados aspectos el cáncer o tumor recidivante no era inicialmente un cáncer o tumor que expresara P-cadherina, sino que se convierte en un cáncer positivo para P-cadherina que es un cáncer o tumor resistente a tirosina cinasa o recidivante después del tratamiento con inhibidores de tirosina cinasa (por ejemplo, trastuzumab o trastuzumab emtansina).

Para el tratamiento de la enfermedad como se desvela en el presente documento, la dosis adecuada de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., fragmentos de unión a antígeno) o conjugados de anticuerpos y fármacos depende de diversos factores, tales como el tipo de enfermedad que se va a tratar, la gravedad y la evolución de la enfermedad, la capacidad de respuesta de la enfermedad, la terapia previa, el historial clínico del paciente, etcétera. El anticuerpo o agente se puede administrar una vez o a lo largo de una serie de tratamientos que duran desde varios días hasta varios meses, o hasta que se efectúe una cura o se logre una disminución de la patología (p. ej., reducción del tamaño del tumor). Los esquemas de dosificación óptimos se pueden calcular a partir de mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente y variarán en función de la potencia relativa de un anticuerpo individual, fragmento de anticuerpo (p. ej., fragmento de unión a antígeno) o conjugados de anticuerpos y fármacos. El médico responsable puede estimar las tasas de repetición para la dosificación en función de los tiempos de permanencia medidos y las concentraciones del fármaco en líquidos o tejidos corporales.

Terapia de combinación

- 5 En determinados casos, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo (p. ej., fragmento de unión a antígeno) o conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención se combina con otros agentes terapéuticos, tales como otros agentes antineoplásicos, agentes antialérgicos, agentes contra las náuseas (o antieméticos), analgésicos, agentes citoprotectores y combinaciones de los mismos.
- 10 En una realización, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo (p. ej., fragmento de unión a antígeno) o conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención se combina en una formulación de combinación farmacéutica, o régimen de dosificación como terapia combinada, con un segundo compuesto que tiene propiedades antineoplásicas. El segundo compuesto de la formulación o el régimen de dosificación de combinación farmacéutica puede tener actividades complementarias al anticuerpo o inmunconjugado de la combinación de modo que no se afecten negativamente entre sí. Por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de anticuerpo (p. ej., fragmento de unión a antígeno) o el conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención se puede administrar en combinación con, pero sin limitación, un agente quimioterapéutico, un inhibidor de la tirosina cinasa, un inhibidor de la ruta de señalización posterior de P-cadherina, inhibidores de IAP, inhibidores de Bcl2, inhibidores de Mcl1 y otros inhibidores de P-cadherina.
- 15 La expresión "combinación farmacéutica", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una combinación fija en una forma farmacéutica unitaria o una combinación no fija o un kit de partes para la administración combinada donde dos o más agentes terapéuticos pueden administrarse independientemente al mismo tiempo o por separado dentro de los intervalos de tiempo, especialmente cuando estos intervalos de tiempo permiten que los compañeros de la combinación muestren un efecto cooperativo, p. ej., sinérgico.
- 20 La expresión "terapia combinada" se refiere a la administración de dos o más agentes terapéuticos para tratar una afección o trastorno terapéutico que se describe en la presente divulgación. Dicha administración engloba la coadministración de estos agentes terapéuticos de una manera sustancialmente simultánea, tal como en una única cápsula que tiene una proporción fija de los principios activos. Como alternativa, una administración de este tipo engloba la coadministración en recipientes múltiples o independientes (p. ej., cápsulas, polvos y líquidos) para cada principio activo. Los polvos y/o líquidos se pueden reconstituir o diluir a la dosis deseada antes de la administración. Además, dicha administración también engloba el uso de cada tipo de agente terapéutico de una manera secuencial, ya sea aproximadamente al mismo tiempo o en momentos diferentes. En cualquier caso, la pauta de tratamiento proporcionará efectos beneficiosos de la combinación farmacológica para tratar las afecciones o trastornos descritos en el presente documento.
- 25 La terapia combinada puede proporcionar "sinergia" y ser "sinérgica", es decir, el efecto logrado cuando los principios activos se usan juntos es mayor que la suma de los efectos que resultan del uso de los compuestos por separado. Se puede lograr un efecto sinérgico cuando los principios activos son: (1) coformulados y administrados o suministrados simultáneamente en una formulación de dosis unitaria combinada; (2) suministrados por alternancia o en paralelo como formulaciones separadas; o (3) en alguna otra pauta. Cuando se administran en terapia alternante, se puede lograr un efecto sinérgico cuando los compuestos se administran o suministran secuencialmente, p. ej., mediante diferentes inyecciones en jeringas separadas. En general, durante la terapia alternante, se administra una dosis eficaz de cada uno de los principios activos secuencialmente, es decir, en serie, mientras que en la terapia combinada, se administran dosis eficaces de dos o más principios activos juntas.
- 30 Los agentes quimioterapéuticos generales considerados para su uso en terapias combinadas incluyen anastrozol (Arimidex®), bicalutamida (Casodex®), sulfato de bleomicina (Blenoxane®), busulfán (Myleran®), busulfán para inyección (Busulfex®), capecitabina (Xeloda®), N4-pentoxicarbonil-5-desoxi-5-fluorocitidina, carboplatino (Paraplatin®), carmustina (BiCNU®), clorambucilo (Leukeran®), cisplatino (Platinol®), cladribina (Leustatin®), ciclofosfamida (Cytosan® o Neosar®), citarabina, arabinósido de citosina (Cytosar-U®), citarabina en liposomas para inyección (DepoCyt®), dacarbazina (DTIC-Dome®), dactinomicina (Actinomycin D, Cosmegan), clorhidrato de daunorrubicina (Cerubidine®), citrato de daunorrubicina en liposomas para inyección (DaunoXome®), dexametasona, docetaxel (Taxotere®), clorhidrato de doxorubicina (Adriamycin®, Rubex®), etopósido (Vepesid®), fosfato de fludarabina (Fludara®), 5-fluorouracilo (Adrucil®, Efudex®), flutamida (Eulexin®), tezacitibina, Gemcitabina (difluorodesoxicidina), hidroxiurea (Hydrea®), Idarrubicina (Idamycin®), ifosfamida (IFEX®), irinotecán (Camptosar®), L-asparaginasa (ELSPAR®), leucovorina de calcio, melfalán (Alkeran®), 6-mercaptopurina (Purinethol®), metotrexato (Folex®), mitoxantrona (Novantrone®), mylotarg, paclitaxel (Taxol®), phoenix (Itrio90/MX-DTPA), pentostatina, polifeprosán 20 con implante de carmustina (Gliadel®), citrato de tamoxifeno (Nolvadex®), tenipósido (Vumon®), 6-tioguanina, tiotepa, tirapazamina (Tirazone®), clorhidrato de topotecán para inyección (Hycamptin®), vinblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) y vinorelbina (Navelbine®).
- 35 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar el cáncer administrando a un sujeto que lo necesite un conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención en combinación con uno o más inhibidores de tirosina cinasa, incluidos, entre otros, inhibidores de EGFR, inhibidores de Her2, inhibidores de Her3, inhibidores de IGFR e inhibidores de Met.

Por ejemplo, los inhibidores de tirosina cinasas incluyen, pero sin limitación, clorhidrato de erlotinib (Tarceva®); linifanib (N-[4-(3-amino-1H-indazol-4-il)fenil]-N'-(2-fluoro-5-metilfenil)urea, que también se conoce como ABT 869, que se puede adquirir de Genentech); malato de sunitinib (Sutent®); bosutinib (4-[(2,4-dicloro-5-metoxifenil)amino]-6-metoxi-7-[3-(4-metilpiperazin-1-il)propoxi]quinolin-3-carbonitrilo, que también se conoce como SKI-606, y se describe en la patente de los EE. UU. n.º 6.780.996); dasatinib (Sprycel®); pazopanib (Votrient®); sorafenib (Nexavar®); zactima (ZD6474); e imatinib o mesilato de imatinib (Gilevec® y Gleevec®).

Los inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) incluyen, pero sin limitación, clorhidrato de erlotinib (Tarceva®), Gefitinib (Iressa®); N-[4-[(3-Cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[(3"S)-tetrahydro-3-furanil]oxi]-6-quinazolinil]-4(dimetilamino)-2-butenamida, tovok®; Vandetanib (Caprelsa®); Lapatinib (Tykerb®); (3R,4R)-4-Amino-1-((4-((3-metoxifenil)amino)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)metil)piperidin-3-ol (BMS690514); diclorhidrato de canertinib (CI-1033); 6-[4-[(4-etil-1-piperazinil)metil]fenil]-N-[(1R)-1-feniletíl]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-amina (AEE788, CAS 497839-62-0); Mubritinib (TAK165); Pelitinib (EKB569); Afatinib (BIBW2992); Neratinib (HKI-272); éster (3S)-3-morfolinilmetílico del ácido N-[4-[[1-[(3-fluorofenil)metil]-1H-indazol-5-il]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-il]-carbámico (BMS599626); N-(3,4-Dicloro-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[[3aα,5β,6aα]-octahidro-2-metilciclopenta[c]pirrol-5-il]metoxi]-4-quinazolinamina (XL647, CAS 781613-23-8); y 4-[4-[(1R)-1-feniletíl]amino]-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-6-il]-fenol (PKI166, CAS 187724-61-4).

Los anticuerpos contra EGFR incluyen, pero sin limitación, Cetuximab (Erlotinib®); Panitumumab (Vectibix®); Matuzumab (EMD-72000); Trastuzumab (Herceptin®); Nimotuzumab (hR3); Zalutumumab; TheraCIM h-R3; MDX0447 (CAS 339151-96-1); y ch806 (mAb-806, CAS 946414-09-1).

Los inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (receptor Her2) (que también se conoce como Neu, ErbB-2, CD340 o p185) incluyen, pero sin limitación, Trastuzumab (Herceptin®); Pertuzumab (Omnitarg®); emtansina de trastuzumab (Kadcyla®); Neratinib (HKI-272, (2E)-N-[4-[[3-cloro-4-[(piridin-2-il)metoxi]fenil]amino]-3-ciano-7-etoxiquinolin-6-il]-4-(dimetilamino)but-2-enamida, y descrita en la Publicación PCT n.º WO 05/028443); Lapatinib o ditosilato de Lapatinib (Tykerb®); (3R,4R)-4-amino-1-((4-((3-metoxifenil)amino)pirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-5-il)metil)piperidin-3-ol (BMS690514); (2E)-N-[4-[(3-Cloro-4-fluorofenil)amino]-7-[(3S)-tetrahydro-3-furanil]oxi]-6-quinazolinil]-4-(dimetilamino)-2-butenamida (BIBW-2992, CAS 850140-72-6); éster (3S)-3-morfolinilmetílico del ácido N-[4-[[1-[(3-fluorofenil)metil]-1H-indazol-5-il]amino]-5-metilpirrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-6-il]-carbámico (BMS 599626, CAS 714971-09-2); diclorhidrato de Canertinib (PD183805 o CI-1033); y N-(3,4-dicloro-2-fluorofenil)-6-metoxi-7-[[3aα,5β,6aα]-octahidro-2-metilciclopenta[c]pirrol-5-il]metoxi]-4-quinazolinamina (XL647, CAS 781613-23-8).

Los inhibidores de Her3 incluyen, pero sin limitación, LJM716, MM-121, AMG-888, RG7116, REGN-1400, AV-203, MP-RM-1, MM-111 y MEHD-7945A.

Los inhibidores de MET incluyen, pero sin limitación, Cabozantinib (XL184, CAS 849217-68-1); Foretinib (GSK1363089, anteriormente XL880, CAS 849217-64-7); Tivantinib (ARQ197, CAS 1000873-98-2); 1-(2-hidroxi-2-metilpropil)-N-(5-(7-metoxiquinolin-4-iloxi)piridin-2-il)-5-metil-3-oxo-2-fenil-2,3-dihidro-1H-pirazolo-4-carboxamida (AMG 458); Cryzotinib (Xalkori®, PF-02341066); (3Z)-5-(2,3-dihidro-1H-indol-1-ilsulfonil)-3-((3,5-dimetil-4-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-1H-pirrol-2-il]metileno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (SU11271); (3Z)-N-(3-clorofenil)-3-((3,5-dimetil-4-[(4-metilpiperazin-1-il)carbonil]-1H-pirrol-2-il]metileno)-N-metil-2-oxoindolina-5-sulfonamida (SU11274); (3Z)-N-(3-clorofenil)-3-[[3,5-dimetil-4-(3-morfolin-4-ilpropil)-1H-pirrol-2-il]metileno]-N-metil-2-oxoindolina-5-sulfonamida (SU11606); 6-[difluoro[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolo[4,3-b]piridazin-3-il]metil]-quinolina (JNJ38877605, CAS 943540-75-8); 2-[4-[1-(quinolin-6-ilmetil)-1H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pirazin-6-il]-1H-pirazol-1-il]etanol (PF04217903, CAS 956905-27-4); N-((2R)-1,4-dioxan-2-ilmetil)-N-metil-N'-[3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-5-oxo-SH-benzo[4,5]ciclohepta[1,2-b]piridin-7-il]sulfamida (MK2461, CAS 917879-39-1); 6-[[6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-1,2,4-triazolo[4,3-b]piridazin 3-il]tio]-quinolina (SGX523, CAS 1022150-57-7); y (3Z)-5-[[[(2,6-diclorofenil)metil]sulfonil]-3-[[3,5-dimetil-4-[(2R)-2-(1-pirrolidinilmetil)-1-pirrolidinil]carbonil]-1H-pirrol-2-il]metileno]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (PHA665752, CAS 477575-56-7).

Los inhibidores de IGF1R incluyen, pero sin limitación, BMS-754807, XL-228, OSI-906, GSK0904529A, A-928605, AXL1717, KW-2450, MK0646, AMG479, IMCA12, MEDI-573 y BI836845. Véase, p. ej., Yee, *JNCI*, 104; 975 (2012) para consultar una revisión.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar el cáncer administrando a un sujeto que lo necesite un conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención en combinación con uno o más inhibidores de la ruta de señalización posterior de P-cadherina, incluidos, pero sin limitación, inhibidores de MEK, inhibidores de Braf, inhibidores de PI3K/Akt, inhibidores de SHP2 y también mTor.

Por ejemplo, los inhibidores de la proteína cinasa activada por mitógenos (MEK) incluyen, pero sin limitación, XL-518 (que también se conoce como GDC-0973, Cas n.º 1029872-29-4, disponible de ACC Corp.); 2-[(2-cloro-4-yodofenil)amino]-N-(ciclopropilmetoxi)-3,4-difluoro-benzamida (que también se conoce como CI-1040 o PD184352 y descrita en la publicación PCT n.º WO2000035436); N-[(2R)-2,3-dihidroxipropoxi]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-benzamida (que también se conoce como PD0325901 y descrita en la publicación PCT n.º WO2002006213); 2,3-bis[amino[(2-aminofenil)tio]metileno]-butanodinitrilo (que también se conoce como U0126 y descrito en la patente de los EE. UU. n.º 2.779.780); N-[3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-yodofenil)amino]-6-metoxifenil]-1-[(2R)-2,3-dihidroxipropil]-

ciclopropanosulfonamida (que también se conoce como RDEA119 o BAY869766 y descrita en la publicación PCT n.º WO2007014011); (3S,4R,5Z,8S,9S,11E)-14-(etilamino)-8,9,16-trihidroxi-3,4-dimetil-3,4,9,19-tetrahidro-1H-2-benzoxacicotetradecina-1,7(8H)-diona] (que también se conoce como E6201 y descrita en la publicación PCT n.º WO2003076424); 2'-amino-3'-metoxiflavona (que también se conoce como PD98059 disponible de Biaffin GmbH & Co., KG, Alemania); Vemurafenib (PLX-4032, CAS 918504-65-1); (R)-3-(2,3-dihidroxiopropil)-6-fluoro-5-(2-fluoro-4-yodofenilamino)-8-metilpirido[2,3-d]pirimidina-4,7(3H,8H)-diona (TAK-733, CAS 1035555-63-5);

Pimasertib (AS-703026, CAS 1204531-26-9); y dimetilsulfóxido de trametinib (GSK-1120212, CAS 1204531-25-80).

Los inhibidores de fosfoinositida 3-cinasa (PI3K) incluyen, pero sin limitación, 4-[2-(1H-Indazol-4-il)-6-[[4-(metilsulfonil)piperazin-1-il]metil]tieno[3,2-d]pirimidin-4-il]morfolina (que también se conoce como GDC 0941 y descrita en las publicaciones PCT n.º WO 09/036082 y WO 09/055730); 2-metil-2-[4-[3-metil-2-oxo-8-(quinolin-3-il)-2,3-dihidroimidazo[4,5-c]quinolin-1-il]fenil]propionitrilo (que también se conoce como BEZ 235 o NVP-BEZ 235, y descrito en la publicación PCT n.º WO 06/122806); 4-(trifluorometil)-5-(2,6-dimorfolinopirimidin-4-il)piridin-2-amina (que también se conoce como BKM120 o NVP-BKM120, y descrita en la publicación PCT n.º WO2007/084786); Tozasertib (VX680 o MK-0457, CAS 639089-54-6); (5Z)-5-[[4-(4-piridinil)-6-quinolinil]metileno]-2,4-tiazolidinadiona (GSK1059615, CAS 958852-01-2); (1E,4S,4aR,5R,6aS,9aR)-5-(acetiloxi)-1-[(di-2-propenilamino)metileno]-4,4a,5,6,6a,8,9,9a-octahidro-11-hidroxi-4-(metoximetil)-4a,6a-dimetil-ciclopenta[5,6]nafto[1,2-c]piran-2,7,10(1H)-triona (PX866, CAS 502632-66-8); y 8-fenil-2-(morfolin-4-il)-cromen-4-ona (LY294002, CAS 154447-36-6).

Los mTor incluyen, pero sin limitación, Temsirolimus (Torisel®); Ridaforolimus (que se conoce formalmente como deferolimus, dimetilfosfinato de (1R,2R,4S)-4-[(2R)-2[(1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28Z,30S,32S,35R)-1,18-dihidroxi-19,30-dimetoxi-15,17,21,23,29,35-hexametil-2,3,10,14,20-pentaoxo-11,36-dioxa-4-azatriciclo[30.3.1.0^{4,9}] hexatriaconta-16,24,26,28-tetraen-12-il]propil]-2-metoxiciclohexilo, que también se conoce como AP23573 y MK8669, y descrito en la publicación PCT n.º WO 03/064383); everolimus (Afinitor® o RAD001); rapamicina (AY22989, Sirolimus®); simapimod (CAS 164301-51-3); (5-{2,4-Bis[(3S)-3-metilmorfolin-4-il]pirido[2,3-d]pirimidin-7-il}-2-metoxifenil)metanol (AZD8055); 2-amino-8-[trans-4-(2-hidroxi-etoxi)ciclohexil]-6-(6-metoxi-3-piridinil)-4-metil-pirido[2,3-d]pirimidin-7(8H)-ona (PF04691502, CAS 1013101-36-4); y N²-[1,4-dioxo-4-[[4-(4-oxo-8-fenil-4H-1-benzopiran-2-il)morfolinio-4-il]metoxi]butil]-L-arginilglicil-L-α-aspartil-L-serina- (SEQ ID NO: 131), sal interna (SF1126, CAS 936487-67-1).

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un método para tratar el cáncer administrando a un sujeto que lo necesite un conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención en combinación con uno o más proapoptóticos, incluidos, pero sin limitación, inhibidores de IAP, inhibidores de Bcl2, inhibidores de Mcl1, agentes Trail, inhibidores de Chk.

Por ejemplo, los inhibidores de IAP incluyen, pero sin limitación, LCL161, GDC-0917, AEG-35156, AT406 y TL32711. Otros ejemplos de inhibidores de IAP incluyen, pero sin limitación, los desvelados en los documentos WO04/005284, WO 04/007529, WO05/097791, WO 05/069894, WO 05/069888, WO 05/094818, US2006/0014700, US2006/0025347, WO 06/069063, WO 06/010118, WO 06/017295 y WO08/134679.

Los inhibidores de BCL-2 incluyen, pero sin limitación, 4-[4-[[2-(4-clorofenil)-5,5-dimetil-1-ciclohexen-1-il]metil]-1-piperazinil]-N-[[4-[[[(1R)-3-(4-morfolinil)-1-[(feniltio)metil]propil]amino]-3-[(trifluorometil)sulfonil]fenil]sulfonil]benzamida (que también se conoce como ABT-263 y descrita en la publicación PCT n.º WO 09/155386); tetrocarina A; antimicina; gosipol ((-)-BL-193); obatoclax; etil-2-amino-6-ciclopentil-4-(1-ciano-2-etoxi-2-oxoetil)-4H-cromona-3-carboxilato (HA14-1); Oblimersen (G3139, Genasense®); péptido BH3 de Bak; ácido (-)-gosipol acético (AT-101); 4-[4-[[4'-cloro[1,1'-bifenil]-2-il]metil]-1-piperazinil]-N-[[4-[[[(1R)-3-(dimetilamino)-1-[(feniltio)metil]propil]amino]-3-nitrofenil]sulfonil]-benzamida (ABT-737, CAS 852808-04-9); y Navitoclax (ABT-263, CAS 923564-51-6).

Los agonistas del receptor proapoptótico (PARA), incluidos DR4 (TRAILR1) y DR5 (TRAILR2), incluyen, pero sin limitación, Dulanermin (AMG-951, RhApo2LATRAIL); Mapatumumab (HRS-ETR1, CAS 658052-09-6); Lexatumumab (HGS-ETR2, CAS 845816-02-6); Apomab (Apomab®); Conatumumab (AMG655, CAS 896731-82-1); y Tigatuzumab (CS1008, CAS 946415-34-5, disponible de Daiichi Sankyo).

Los inhibidores de la cinasa de punto de control (CHK) incluyen, pero sin limitación, 7-hidroxiestaurosporina (UCN-01); 6-bromo-3-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-5-(3R)-3-piperidinil-pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-amina (SCH900776, CAS 891494-63-6); N-[(S)-piperidin-3-il]amida del ácido 5-(3-fluorofenil)-3-ureidotiofeno-2-carboxílico (AZD7762, CAS 860352-01-8); 4-[[[(3S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]amino]-3-(1H-bencimidazol-2-il)-6-cloroquinolin-2(1H)-ona (CHIR 124, CAS 405168-58-3); 7-aminodactinomicina (7-AAD), Isogranulatimida, debromohimenialdisina; N-[5-bromo-4-metil-2-[(2S)-2-morfolinilmetoxi]-fenil]-N'-(5-metil-2-pirazinil)urea (LY2603618, CAS 911222-45-2); Sulforafano (CAS 4478-93-7, isotiocianato de 4-metilsulfonilbutilo); 9,10,11,12-tetrahidro-9,12-epoxi-1H-diindolo[1,2,3-fg:3',2',1'-k']pirrolo[3,4-i][1,6]benzodiazocina-1,3(2H)-diona (SB-218078, CAS 135897-06-2); y TAT-S216A (YGRKKRRQRRRLRSPAMPENL (SEQ ID NO: 132)) y CBP501 ((d-Bpa)sws(d-Phe-F5)(d-Cha)rrrrqr).

En una realización adicional, la presente divulgación proporciona un método para tratar el cáncer administrando a un sujeto que lo necesite un conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención en combinación con uno o más inmunomoduladores (p. ej., uno o más de: un activador de una molécula coestimuladora o un inhibidor de una molécula de punto de control inmunitario).

En determinadas realizaciones, el inmunomodulador es un activador de una molécula coestimuladora. En una realización, el agonista de la molécula coestimuladora se elige entre un agonista (p. ej., un anticuerpo agonista o fragmento de unión a antígeno del mismo, o una fusión soluble) de ligando de OX40, CD2, CD27, CDS, ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD30, CD40, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, B7-H3 o CD83.

En determinadas realizaciones, el inmunomodulador es un inhibidor de una molécula de punto de control inmunitario. En una realización, el inmunomodulador es un inhibidor de PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y/o TGFR beta. En una realización, el inhibidor de una molécula de punto de control inmunitario inhibe PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3 o CTLA4, o cualquier combinación de los mismos. El término "inhibición" o "inhibidor" incluye una reducción en un determinado parámetro, p. ej., una actividad, de una molécula dada, p. ej., un inhibidor del punto de control inmunitario. Por ejemplo, se incluye en este término la inhibición de una actividad, p. ej., una actividad de PD-1 o PD-L1, de al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 % o más. Por lo tanto, no es necesario que la inhibición sea de un 100 %.

La inhibición de una molécula inhibidora se puede realizar a nivel de ADN, ARN o proteína. En algunas realizaciones, se puede usar un ácido nucleico inhibidor (p. ej., un ARNbc, ARNip o ARNhp) para inhibir la expresión de una molécula inhibidora. En otras realizaciones, el inhibidor de una señal inhibidora es un polipéptido, p. ej., un ligando soluble (p. ej., PD-1-Ig o Ig contra CTLA-4), o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une a la molécula inhibidora; p. ej., un anticuerpo o fragmento del mismo (también denominado en el presente documento "una molécula de anticuerpo") que se une a PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA4, TIM3, LAG3, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, CD160, 2B4 y/o TGFR beta, o una combinación de los mismos.

En una realización, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo completo o fragmento del mismo (p. ej., un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o Fv monocatenario (scFv)). En otras realizaciones más, la molécula de anticuerpo tiene una región constante (Fc) de cadena pesada escogida entre, p. ej., las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE; particularmente escogidas entre, p. ej., las regiones constantes de cadena pesada de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, más particularmente, la región constante de cadena pesada de IgG1 o IgG4 (p. ej., IgG1 o IgG4 humana). En una realización, la región constante de cadena pesada es IgG1 humana o IgG4 humana. En una realización, la región constante está alterada, p. ej., mutada, para modificar las propiedades de la molécula de anticuerpo (p. ej., para aumentar o disminuir uno o más de: la unión al receptor de Fc, glucosilación del anticuerpo, el número de restos de cisteína, la función de las células efectoras o la función del complemento).

Composiciones farmacéuticas

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles que incluyen inmunoconjugados, los inmunoconjugados de la invención se mezclan con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones pueden contener adicionalmente uno o más agentes terapéuticos diferentes que sean adecuados para tratar o prevenir el cáncer (incluidos, pero sin limitación, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer de esófago de Barrett, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, osteosarcoma, carcinoma de células escamosas, tumores de la vaina de los nervios periféricos, schwannoma, glioblastoma, sarcoma de células claras de tejido blando, mesotelioma maligno, neurofibromatosis, cáncer renal, melanoma, cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna (HPB), ginecomastia y rabdomiosarcoma).

Se pueden preparar formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico mezclando con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables en forma de, p. ej., polvos liofilizados, suspensiones espesas, soluciones acuosas, lociones o suspensiones (véase, p. ej., Hardman *et al.*, *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, Nueva York, N.Y., 2001; Gennaro, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, Williams y Wilkins, Nueva York, N.Y., 2000; Avis, *et al.* (eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, *et al.* (eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: tablets*, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman, *et al.* (eds.) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner y Kotkoskie, *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 2000).

En una realización, la formulación para investigación clínica (CSF) de los conjugados de anticuerpos y fármacos de la presente invención es un liofilizado en un vial que contiene CAF, histidina, sacarosa y polisorbato 20. El liofilizado se puede reconstituir con agua para inyección y la solución comprende el CAF, histidina, sacarosa y polisorbato 20 a un pH de aproximadamente 5,0. En una realización específica, el liofilizado comprende 10 mg/ml del CAF, histidina 20 mM, sacarosa 240 mM y polisorbato 20 al 0,02 %, a pH 5,3.

La selección de una pauta de administración para un agente terapéutico depende de varios factores, que incluyen la tasa de recambio de tejido o suero de la entidad, el nivel de síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. En determinadas realizaciones, una pauta de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente compatible con un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de agente biológico administrado depende en parte de la entidad particular y de la gravedad de la afección que se esté tratando. Se dispone de directrices para seleccionar las dosis adecuadas de anticuerpos, citocinas y moléculas pequeñas (véase, p. ej., Wawrzynczak, *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido, 1996; Kresina (ed.), *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y., 1991; Bach (ed.), *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y., 1993; Baert *et al.*, *New Engl. J. Med.* 348:601-608, 2003; Milgrom *et al.*, *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973, 1999; Slamon *et al.*, *New Engl. J. Med.* 344:783-792, 2001; Beniaminovitz *et al.*, *New Engl. J. Med.* 342:613-619, 2000; Ghosh *et al.*, *New Engl. J. Med.* 348:24-32, 2003; Lipsky *et al.*, *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602, 2000).

La determinación de la dosis adecuada la realiza el médico, p. ej., utilizando parámetros o factores conocidos o de los que se sospecha en la técnica que afectan al tratamiento o que se prevé que afecten al tratamiento. En general, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y después se aumenta en pequeñas cantidades hasta que se logra el efecto deseado u óptimo con respecto a cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen las de los síntomas, p. ej., de la inflamación o el nivel de citocinas inflamatorias producidas.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse con el fin de obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de diversos factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, la sal o la amida de las mismas, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, el estado de salud general y el historial médico previo del paciente tratado, y factores similares conocidos en la técnica médica.

Pueden proporcionarse composiciones que comprenden anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención mediante infusión continua, o por dosis a intervalos de, p. ej., un día, una semana o 1-7 veces por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez cada cinco semanas, una vez cada seis semanas, una vez cada siete semanas o una vez cada ocho semanas. Las dosis se pueden administrar por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía tópica, por vía oral, por vía nasal, por vía rectal, por vía intramuscular, por vía intracerebral o por inhalación. Un protocolo de dosificación específico es uno que implica la dosis o frecuencia de dosis máxima que evita efectos secundarios no deseables significativos.

Para los inmunoconjugados de la invención, la dosis administrada a un paciente puede ser de 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosis puede ser de entre 0,0001 mg/kg y 30 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, de 0,0001 mg/kg a 0,25 mg/kg, de 0,0001 a 0,15 mg/kg, de 0,0001 a 0,10 mg/kg, de 0,001 a 0,5 mg/kg, de 0,01 a 0,25 mg/kg o de 0,01 a 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosis de los anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se puede calcular usando el peso del paciente en kilogramos (kg) multiplicado por la dosis que se va administrar en mg/kg.

Las dosis de los inmunoconjugados de la invención pueden repetirse y las administraciones pueden estar separadas por menos de 1 día, al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses, 4 meses, 5 meses o al menos 6 meses. En algunas realizaciones, los inmunoconjugados de la invención se pueden proporcionar dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas o con menos frecuencia. En una realización específica, las dosis de los inmunoconjugados de la invención se repiten cada 2 semanas.

Una cantidad eficaz para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se trate, la salud general del paciente, el método, la vía y la dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios (véase, p. ej., Maynard *et al.*, *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Ratón, Fla., 1996; Dent, *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., Londres, Reino Unido, 2001).

La vía de administración puede ser, p. ej., mediante aplicación tópica o cutánea, inyección o infusión por administración subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracefalorraquídea, intralesional o mediante sistemas de liberación sostenida o un implante (véase, p. ej., Sidman *et al.*, *Biopolymers* 22: 547-556, 1983; Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277, 1981; Langer, *Chem. Tech.* 12: 98-105, 1982; Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 82:3688-3692, 1985; Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 77: 4030-4034, 1980; patentes de los EE. UU. n.º 6.350.466 y 6.316.024). Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante o un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección, o ambos. Además, también se puede emplear la administración pulmonar, p. ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y

la formulación con un agente aerosolizante. Véanse, p. ej., las patentes de los EE. UU. n.º 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y las publicaciones de PCT n.º WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903.

5 Una composición de la presente invención también puede administrarse mediante una o más vías de administración utilizando uno o más de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las vías de administración seleccionadas para los inmunoconjugados de la invención incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, raquídea u otras vías de administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o infusión. La administración parenteral puede representar modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, habitualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea, epidural e intraesternal. Como alternativa, una composición de la invención se puede administrar a través de una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica. En una realización, los inmunoconjugados de la invención se administran mediante infusión. En otra realización, los inmunoconjugados de la invención se administran por vía subcutánea.

Si los inmunoconjugados de la invención se administran en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida, se puede usar una bomba para lograr la liberación controlada o sostenida (véanse Langer, citado anteriormente; Sefton, (1987) *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald *et al.*, (1980), *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, (1989) *N. Engl. J. Med.* 321:574). Se pueden utilizar materiales poliméricos para lograr una liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véase, p. ej., *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, Fla., 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York, 1984; Ranger y Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); véase también Levy *et al.*, *Science* 228:190, 1985; During *et al.*, *Ann. Neurol.* 25:351, 1989; Howard *et al.*, *J. Neurosurg.* 71:105, 1989; patente de los EE. UU. n.º 5.679.377, patente de los EE. UU. n.º 5.916.597, patente de los EE. UU. n.º 5.912.015, patente de los EE. UU. n.º 5.989.463, patente de los EE. UU. n.º 5.128.326; publicación PCT n.º WO 99/15154; y publicación PCT n.º WO 99/20253. Los ejemplos de polímeros utilizados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitación, poli(metacrilato de 2-hidroxi etilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En una realización, el polímero utilizado en una formulación de liberación sostenida es inerte, está exento de impurezas lixiviables, es estable en el almacenamiento, estéril y biodegradable. Un sistema de liberación controlada o sostenida se puede colocar próximo a la diana profiláctica o terapéutica, de modo que solo es necesaria una fracción de la dosis sistémica (véase, p. ej., Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, citado anteriormente, vol. 2, págs. 115-138, 1984).

Se analizan otros sistemas de liberación controlada en la revisión de Langer (*Science* 249:1527-1533, 1990). Se puede usar cualquier técnica conocida por un experto en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida que comprendan uno o más inmunoconjugados de la invención. Véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 4.526.938, la publicación PCT WO 91/05548, la publicación PCT WO 96/20698, Ning *et al.*, *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, 1996; Song *et al.*, *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, 1995; Cleek *et al.*, *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, 1997; y Lam *et al.*, *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, 1997.

Si los inmunoconjugados de la invención se administran por vía tópica, se pueden formular en forma de una pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, pulverización, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por un experto en la materia. Véase, p. ej., *Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19.^a ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Para formas farmacéuticas de administración tópica no pulverizables, se emplean normalmente formas entre viscosas y semisólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica y que tienen una viscosidad dinámica, en algunos casos, mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, bálsamos y similares, que, si se desea, se esterilizan o se mezclan con agentes auxiliares (p. ej., conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, tampones o sales) para influir en diversas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas farmacéuticas tópicas adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizables en donde el principio activo, en algunos casos, en combinación con un vehículo inerte sólido o líquido, se envasa en una mezcla con un componente volátil presurizado (p. ej., un propulsor gaseoso, tal como freón) o en un frasco exprimible. Si se desea, también se pueden añadir hidratantes o humectantes a las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas. Se conocen bien en la técnica ejemplos de dichos ingredientes adicionales.

Si las composiciones que comprenden los inmunoconjugados se administran por vía intranasal, se pueden formular en forma de aerosol, pulverización, neblina o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para uso según la presente invención se pueden administrar convenientemente en forma de una presentación de pulverización en forma de aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (p. ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar

una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos (compuestos, p. ej., de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

- 5 En la técnica se conocen métodos para la administración conjunta o el tratamiento con un segundo agente terapéutico, p. ej., una citocina, un esteroide, agente quimioterapéutico, antibiótico o radiación, (véase, p. ej., Hardman *et al.*, (eds.) (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10.^a edición, McGraw-Hill, Nueva York, N.Y.; Poole y Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams y Wilkins, Filadelfia, Pa.; Chabner y Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams y Wilkins, Filadelfia, Pa.). Una cantidad eficaz de un agente terapéutico puede disminuir los síntomas en al menos un 10 %; en al menos un 20 %; al menos un 30 %; al menos un 40 % o al menos un 50 %.

15 Pueden administrarse terapias adicionales (p. ej., agentes profilácticos o terapéuticos), que pueden administrarse en combinación con los inmunoconjugados de la invención con menos de 5 minutos de diferencia, menos de 30 minutos de diferencia, 1 hora de diferencia, a aproximadamente 1 hora de diferencia, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas de diferencia, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, de aproximadamente 12 horas a 18 horas de diferencia, de 18 horas a 24 horas de diferencia, de 24 horas a 36 horas de diferencia, de 36 horas a 48 horas de diferencia, de 48 horas a 52 horas de diferencia, de 52 horas a 60 horas de diferencia, de 60 horas a 72 horas de diferencia, de 72 horas a 84 horas de diferencia, de 84 horas a 96 horas de diferencia o de 96 horas a 120 horas de diferencia de los inmunoconjugados de la invención. Las dos o más terapias pueden administrarse en una misma visita al paciente.

30 En determinadas realizaciones, los inmunoconjugados de la invención pueden formularse para garantizar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHE) excluye muchos compuestos muy hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BHE (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para consultar métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. n.º 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones que se transportan selectivamente a células u órganos específicos, mejorando de este modo la administración dirigida del fármaco (véase, p. ej., Ranade, (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Las fracciones de direccionamiento ilustrativas incluyen folato o biotina (véase, p. ej., la patente de los EE. UU. n.º 5.416.016 de Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (Bloeman *et al.*, (1995) *FEBS Lett.* 357:140; Owais *et al.*, (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de Proteína A tensorioactivo (Briscoe *et al.*, (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p 120 (Schreier *et al.*, (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véase también K. Keinänen; M. L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J. J. Killian; I. J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

40 La divulgación proporciona protocolos para la administración a un sujeto que lo necesite de una composición farmacéutica que comprende inmunoconjugados de la invención, sola o en combinación con otras terapias. Las terapias (p. ej., agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias combinadas de la presente invención pueden administrarse a un sujeto de forma simultánea o secuencial. La terapia (p. ej., agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias combinadas también se puede administrar de forma cíclica. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (p. ej., un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, seguida de la administración de una segunda terapia (p. ej., un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo y repetir esta administración secuencial, es decir, el ciclo, con el fin de reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias (p. ej., agentes) para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias (p. ej., agentes) y/o mejorar la eficacia de las terapias.

50 Las terapias (p. ej., agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias combinadas se pueden administrar a un sujeto simultáneamente.

55 El término "simultáneamente" no se limita a la administración de terapias (p. ej., agentes profilácticos o terapéuticos) exactamente al mismo tiempo, sino que significa que una composición farmacéutica que comprende anticuerpos o fragmentos de los mismos de la invención se administra a un sujeto en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo tales que los conjugados de anticuerpos y fármacos de la invención puedan actuar junto con la o las otras terapias para proporcionar un mayor beneficio que si se administraran de otra manera. Por ejemplo, cada terapia se puede administrar a un sujeto al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deben administrarse lo suficientemente cerca en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada terapia se puede administrar a un sujeto por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. En diversas realizaciones, las terapias (p. ej., agentes profilácticos o terapéuticos), se administran a un sujeto con menos de 5 minutos de diferencia, menos de 15 minutos de diferencia, menos de 30 minutos de diferencia, menos de 1 hora de diferencia, a aproximadamente 1 hora de diferencia, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia,

- de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, aproximadamente 24 horas de diferencia, aproximadamente 48 horas de diferencia, aproximadamente 72 horas de diferencia o 1 semana de diferencia. En otras realizaciones, se administran dos o más terapias (p. ej., agentes profilácticos o terapéuticos) en la misma visita del paciente.
- Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias combinadas se pueden administrar a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Como alternativa, los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias combinadas se pueden administrar simultáneamente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar a un sujeto por las mismas o diferentes vías de administración. Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias combinadas se pueden administrar a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Como alternativa, los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias combinadas se pueden administrar simultáneamente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Los agentes profilácticos o terapéuticos se pueden administrar a un sujeto por las mismas o diferentes vías de administración.

Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de anticuerpos

Generación de construcciones de expresión para proteínas P-cadherinas humanas, de macaco cangrejero, de ratón y de rata

- Los dominios extracelulares (DEC) de P-cadherina humanos, de ratón y de rata se sintetizaron genéticamente basándose en secuencias de aminoácidos de las bases de datos GenBank o Uniprot (véase la tabla 2 a continuación). Se sintetizó genéticamente un molde de ADNc de DEC de P-cadherina de macaco cangrejero basándose en la información de la secuencia de aminoácidos generada utilizando ARNm aislado de diversos tejidos de macaco. Todos los fragmentos de ADN sintetizados se clonaron en vectores de expresión adecuados con marcador de hexahistidina C-terminal (SEQ ID NO: 130) para permitir la purificación.

Tabla 2: Información de secuencia de aminoácidos para P-cadherina

Nombre	Descripción	Número de referencia o secuencia	SEQ ID NO
P-cadherina humana (CDH3) D1-5	CDH3 humana, restos 108-652-MARCADOR	NM_001793.4, NP_001784	121
P-cadherina de rata (CDH3) D1-5	CDH3 de rata, residuos 100-647-MARCADOR	NM_053938.1, NP_446390	122
P-cadherina de ratón (CDH3) D1-5	Isoforma a de CDH3 de ratón, restos 100-647-MARCADOR	NM_001037809.5, NP_001032898	123
P-cadherina de macaco cangrejero var. 1 (CDH3) D1-5	CDH3 de macaco cangrejero variante 1, restos 108-654-MARCADOR	MKFLVNVALVFMVVYISYIYADHQ TSLYKKAGFEGDRTDWVVAPISVP ENGKGFPQRLNQLKSNKDRDTKI	124

Nombre	Descripción	Número de referencia o secuencia	SEQ ID NO
		<p>FYSITGPGADSPPEGVFAVEKETG WLLLNKPLDREEIAKYELFGHAVS ENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKP KFTQDTFRGSVLEGVLPGTSVMQV TATDEDDAIHTYNGVVAYSISHSQE PKDPHDLMFTIHRSTGTISVISSG LDREKVPEYTLTIQATDMDGDGST TTAVAVVEILDANDNAPVFDPOKY ESHVPENAVGHEVQRLTVTDLDAP NSPAWRATYLVGGDDGDHFTIAT HPESNQGILTTRKGLDFEAKNQHT LYVEVTNEAPFVLKLPTSTATIVV HVEDVNEAPVFVPPSKVVEVQEGI PTGEAVCVYTAKDPDENQKISYR ILRDPAGWLAMDPSGQVTVAGTL DREDERFVRNNIYEVMLAVDNGS PPTTGTGTLTLLTIDVNDHGPVPE PREITICNQSPESQVLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWMAEVNE KDDTVVLSLKKFLKQDTYDVHLSL SDHGNKEQLTVIRATVCDCHGHVE KCPDPWKGGGAHHHHHHGA</p>	
P-cadherina de macaco cangrejero var. 2 (CDH3) D1-5	CDH3 de macaco cangrejero variante 2, restos 108-654-MARCADOR	<p>MKFLVNVALVFMVYIISYIYADHQ TSLYKKAGFEGDRTDWVAPISVP ENGKGFPFQRLNQLKSNKDRDTKI FYSITGPGADSPPEGVFAVEKETG WLLLNKPLDREEIAKYELFGHAVS ENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKP KFTQDTFRGSVLEGVLPGTSVMQV TATDEDDAIHTYNGVVAYSISHSQE PKDPHDLMFTIHRSTGTISVISSG LDREKVPEYTLTIQATDMDGDGST TTAVAVVEILDANDNAPVFDPOKY ESHVPENAVGHEVQRLTVTDLDAP NSPAWRATYLVGGDDGDHFTIAT HPESNQGILTTRKGLDFEAKNQHT LYVEVTNEAPFVLKLPTSTATIVV HVEDVNEAPVFVPPSKVVEVQEGI PTGEAVCVYTAKDPDENQKISYR ILRDPAGWLAMDPSGQVTVAGTL DREDERFVRNNIYEVMLAVDNGS PPTTGTGTLTLLTIDVNDHGPVPE PREITICNQSPESQVLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWMAEVNE KDDTVVLSLKKFLKQGTYDVHLSL SDHGNKEQLTVIRATVCDCHGHVE KCPDPWKGGGAHHHHHHGA</p>	125

Generación de baculovirus de P-cadherina

Se generaron baculovirus que expresaban de proteínas de DEC P-cadherinas recombinantes mediante el método de cotransfección/purificación en placas (O'Reilly *et al.*, 1992) o el método del sistema de expresión Bac-To-Bac (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. El virus generado a partir de las células de insecto transfectadas se amplificó utilizando un método de infección estándar de baja MDI.

Expresión de proteínas P-cadherinas recombinantes

Se sembraron cultivos en suspensión de células Tn5 que crecían en medios sin suero (receta patentada y elaborada de forma interna) a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/ml y se infectaron de forma sincrónica con baculovirus de P-cadherina recombinante a una MDI de 10 ufp/ml o un volumen del 3 %. Las preparaciones de cultivo de baculovirus de P-cadherina se propagaron en matraces de Erlenmeyer de vidrio de 2 l o en un biorreactor Wave (GE Healthcare Life Sciences). Las preparaciones de P-cadherina expresadas en matraces de 2 l se agitaron a 120 rpm a 27 °C en medio sin suero. Las preparaciones expresadas en el biorreactor Wave se agitaron a 25 rpm con un ángulo de 7,5° a 28 °C. El sobrenadante recogido de los matraces o del biorreactor Wave se recogió 2 días después de la infección centrifugando el cultivo a 4 °C durante 10 minutos a 1800 rpm. A continuación se filtró el sobrenadante con una unidad de filtro de 0,2 µm. Para una expresión superior a 1 l, el sobrenadante del cultivo celular se concentra 2-10x utilizando el sistema AKTAcrossflow (GE Healthcare Life Sciences) con un casete de lámina plana de ultrafiltración KwickStart. El material concentrado se filtró con una unidad de filtro de 0,2 µm.

Purificación de proteínas de DEC pCAD humanas, de macaco cangrejero, de ratón y de rata

Las proteínas del dominio extracelular pCAD marcadas con hexahistidina recombinantes (SEQ ID NO: 130) (p. ej., pCAD-6xHis humana ("6xHis" desvelada como la SEQ ID NO: 130), pCAD-6xHis cyno1 ("6xHis" desvelada como la SEQ ID NO: 130), pCAD-6xHis cyno2 ("6xHis" desvelada como la SEQ ID NO: 130), pCAD-6xHis de ratón ("6xHis" desvelada como la SEQ ID NO: 130), pCAD-6xHis de rata ("6xHis" desvelada como la SEQ ID NO: 130)) se purificaron del sobrenadante del cultivo celular. El sobrenadante clarificado se pasó a través de una columna de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) sobre resina de níquel Sepharose (GE Healthcare Life Sciences) que se había equilibrado con bisTrisPropano 25 mM, NaCl 0,3 M, CaCl₂ 1 mM, pH 6,2. El sobrenadante se aplica a una columna IMAC a un caudal de 5-8 ml/minuto. Después del lavado inicial con bisTrisPropano 25 mM, NaCl 0,3 M, CaCl₂ 1 mM, pH 6,2, se cambió a tampón de lavado (Tris 20 mM, NaCl 0,3 M, CaCl₂ 1 mM, pH 7,5) para cinco volúmenes de columna. La proteína combinada se concentró si era necesario utilizando concentradores centrífugos Amicon Ultra de 15 ml con límites de peso molecular nominal de 10 kD o 30 kD. A continuación, la proteína combinada se purificó mediante filtración en gel utilizando una columna Superdex 200 26/60 (GE Healthcare Life Sciences) preequilibrada en Tris 20 mM, NaCl 0,3 M, CaCl₂ 1 mM, pH 7,5. Las fracciones pertinentes se combinaron y analizaron mediante SDS-PAGE. Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el ensayo de proteínas de Bradford (Thermal Fisher).

Inmunización de ratones y producción de hibridomas

El DEC de P-cadherina humana purificado se diluyó 1: 1 con adyuvante completo de Freund antes de inmunizar ratones transgénicos Bcl-2 (cepa C57BL/6-Tgn (bcl-2) 22 wehi). Los ratones se inmunizaron utilizando un procedimiento que requiere una inmunización repetitiva en múltiples sitios (RIMMS) (McIntyre GD. Hybridoma 1997). En resumen, se inyectaron 1-3 µg de antígeno a los ratones en 8 sitios específicos próximos a ganglios linfáticos periféricos (GLP). Este procedimiento se repitió 8 veces durante un periodo de 12 días. El día 12, se recogió una muestra de sangre y se analizó el título de anticuerpo en suero mediante ELISA. El día 15, se retiraron los GLP agrupados procedentes de los ratones con un título elevado. Para recoger los linfocitos, los GLP se lavaron dos veces con DMEM sin aditivos y a continuación se disociaron haciéndolos pasar a través de un tamiz de 0,22 micrómetros (Falcon n.º 352350). Los linfocitos resultantes se lavaron 2 veces adicionales antes de la fusión en medio Cytofusion (medio de electroporación BTXpress Cytofusion® cat n.º 47001). Se mezclaron células de mieloma F0 con los linfocitos con una relación de 4 linfocitos por cada célula FO. La mezcla celular se centrifugó, se suspendió en 7 ml de medio Cytofusion y posteriormente se añadió a una cámara de electrofusión de 9 ml (Harvard Apparatus Coaxial Chamber 9ML parte n.º 470020). La electrofusión se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante utilizando el sistema de hibridoma/Hybrimmune CEEF-50B de Cyto Pulse Sciences, Inc. Se permitió que las células fusionadas se recuperaran durante 5 minutos en la cámara, se diluyeron 1/10 en medio de fusión sin HAT (DMEM + FBS al 20 %, Pen/Estrep/Glu, 1x NEAA, 0,5x HFCS) y se colocaron a 37 °C durante una hora. Se añadió medio HAT 4x (DMEM + FBS al 20 %, Pen/Estrep/Glu, NEAA 1x, HAT 4x, HFCS 0,5x) para preparar una solución 1x y la densidad se ajustó a $1,67 \times 10^4$ células/ml. A continuación, las células se sembraron en placas de 384 pocillos a 60 µl/pocillo.

Cribado de hibridomas que secretan anticuerpos contra P-cadherina

Diez días después de la fusión, las placas de hibridomas se cribaron para determinar la presencia de anticuerpos específicos para P-cadherina. Para el cribado mediante ELISA, se recubrieron placas de 384 pocillos Maxisorp (Nunc n.º 464718) con 50 µl de P-cadherina humana (diluida hasta 15 ng/pocillo en PBS) y se incubaron durante una noche a 4 °C.

La proteína restante se aspiró y los pocillos se bloquearon con BSA al 1 % en PBS. Después de 30 min de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavaron cuatro veces con PBS + Tween 0,05 % (PBST). Se transfirieron 15 µl de sobrenadante de hibridoma a las placas de ELISA. Se diluyeron 15 µl de suero de ratón, tomados en el momento de la retirada de GLP, en un factor de 1:1000 en PBS y se añadieron como control positivo. PBST. Se añadieron 50 µl de anticuerpo secundario (anti-IgG-HRP de ratón producido en cabra (Jackson Immuno Research n.º 115-035-071), diluido en un factor de 1:5000 en PBS) a todos los pocillos de las placas de ELISA. Tras una incubación a temperatura ambiente durante 1 h, las placas se lavaron ocho veces con PBST. Se añadieron 25 µl de TMB (KPL n.º 50-76-05) y después de 30 min de incubación a temperatura ambiente; las placas se leyeron a una absorbancia de 605 nm. Las células de los pocillos positivos se expandieron en placas de 24 pocillos en medio HT (DMEM + FBS al 20 %, Pen/Estrep/Glu, NEAA 1x, HT 1x, HFCS 0,5x).

Purificación del anticuerpo

El sobrenadante que contenía anticuerpos se purificó utilizando proteína G (Upstate n.º 16-266 (Billerica, MA)). Antes de introducir el sobrenadante, la resina se equilibró con 10 volúmenes de columna de PBS. Tras la unión de la muestra, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de PBS y a continuación el anticuerpo se eluyó con 5 volúmenes de columna de glicina 0,1 M, pH 2,0. Las fracciones de la columna se neutralizaron inmediatamente con 1/10 del volumen de Tris HCl, pH 9,0. Se midió la DO280 de las fracciones y las fracciones positivas se agruparon y sometieron a diálisis durante una noche frente a PBS, pH 7,2.

Humanización y maduración de afinidad de los anticuerpos anti-P-cadherina

Se humanizaron las secuencias VH y VL de anticuerpos anti-P-cadherina derivados de hibridoma y se maduró su afinidad de la siguiente manera.

Generación de secuencias humanizadas

Las secuencias de ADN que codifican los dominios VL y VH humanizados se solicitaron en GeneArt (Life Technologies, Inc., Regensburg, Alemania) incluyendo la optimización de codones para *Homo sapiens*. Las secuencias que codifican los dominios VL y VH se subclonaron mediante corte y pegado de los vectores derivados de GeneArt en vectores de expresión adecuados para la secreción en células de mamífero. Las cadenas pesada y ligera se clonaron en vectores de expresión individuales para permitir la cotransfección. Los elementos del vector de expresión incluyen un promotor (potenciador-promotor de citomegalovirus (CMV)), una secuencia señal para facilitar la secreción, una señal de poliadenilación y un terminador de la transcripción (gen de la hormona del crecimiento bovina (BGH)), un elemento que permite la replicación episómica y la replicación en procariotas (p. ej., origen de SV40 y ColE1 u otros conocidos en la técnica) y elementos para permitir la selección (gen de resistencia a ampicilina y marcador de zeocina).

Expresión y purificación de anticuerpos humanizados

Las células de riñón embrionario humano que expresan constitutivamente el antígeno T grande de SV40 (HEK293T ATCC11268) son una de las estirpes celulares hospedadoras preferidas para la expresión transitoria de proteínas IgG humanizadas y/u optimizadas. La transfección se realiza usando PEI (polietilenimina, PM lineal 25.000, Polysciences, EE. UU., n.º de cat. 23966) como reactivo de transfección. La solución madre de PEI se prepara disolviendo con cuidado 1 g de PEI en 900 ml de agua de uso en cultivo celular a temperatura ambiente (TA). Para facilitar la disolución de PEI, la solución se acidifica mediante la adición de HCl a pH 3-5, seguido de neutralización con NaOH hasta un pH final de 7,05. Finalmente, el volumen se ajusta a 1 l y la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 µm, se toman alícuotas y se congelan a -80 °C hasta su uso posterior. Una vez descongelada, una alícuota se puede volver a congelar hasta 3 veces a -20 °C, pero no se debe almacenar a largo plazo a -20 °C.

Las células HEK 293T se cultivan utilizando un medio de cultivo sin suero para la transfección y propagación de las células y un medio de cultivo sin suero ExCell VPRO (SAFC Biosciences, EE. UU., n.º de cat. 24561C) como medio de producción/alimentación. Las células preparadas para transfecciones transitorias se cultivan en cultivo en suspensión. Para las transfecciones a pequeña escala (<5 l), las células se cultivan en matraces de agitación Corning (Corning, Tewksbury, MA) en un agitador orbital (100-120 rpm) en una incubadora humidificada al 5 % de CO₂ (matraces de siembra). Las células en los cultivos de semillas deben mantenerse en la fase de crecimiento exponencial (densidades celulares entre 5x10⁵ y 3x10⁶/ml) y presentan una viabilidad de >90 % para la transfección. Las densidades celulares fuera de este intervalo darán lugar a una fase de latencia después de la dilución o una reducción de la eficiencia de transfección. Para la transfección a pequeña escala (<5 l), se extrae una alícuota de células de los cultivos de siembra y se ajusta a 1,4 x 10⁶ células/ml en el 36 % del volumen final con medio de cultivo sin suero de Novartis. La solución de ADN (solución 1: 0,5 mg de plásmido de expresión de cadena pesada y 0,5 mg de cadena ligera para una transfección de 1 l) se prepara diluyendo el ADN a 1 mg/l (volumen final) en el 7 % del volumen de cultivo final seguido de una mezcla suave. Para evitar la contaminación bacteriana, esta solución se filtra usando un filtro de 0,22 µm (p. ej., Millipore Stericup). A continuación, también se diluyen 3 mg/l (volumen final) de solución de PEI en el 7 % del volumen de cultivo final y se mezclan suavemente (solución 2). Ambas soluciones se incuban durante 5-10 min a temperatura ambiente (TA). Después, se añade la solución 2 a la solución 1 con una mezcla suave y se incuba durante otros 5-15 minutos a temperatura

ambiente. La mezcla de transfección se añade después a las células y se prosigue el cultivo de las células durante 4 a 6 horas. Finalmente, el 50 % restante del volumen de producción total se alcanza mediante la adición de medio de cultivo exento de suero ExCell® VPRO. El cultivo celular se continúa durante once días después de la transfección. El cultivo se recoge mediante centrifugación a 4500 rpm durante 20 minutos a 4 °C (Heraeus®, Multifuge 3 S-R, Thermo Scientific, Rockford, IL). El sobrenadante celular recuperado se esteriliza por filtración a través de un filtro stericup (0,22 µm) y se almacena a 4 °C hasta su procesamiento posterior.

La purificación se realizó en un sistema de cromatografía "ÄKTA 100 explorer Air" a 4 °C en una cabina de enfriamiento, usando una columna HiTrap de 5 ml de Proteína A MabSelect®SuRe recién desinfectada (NaOH 0,25 M). La columna se equilibró con 5 CV de PBS (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA) y después se cargó el sobrenadante esterilizado por filtración (2 l) a 4,0 ml/min. La columna se lavó con 8 CV de PBS para eluir la muestra no unida y se lavó nuevamente con 5 CV de PBS. Se eluyó el anticuerpo con 5 CV de citrato 50 mM, NaCl 70 mM, pH 3,2. El eluido se recogió en fracciones de 3 ml; se agruparon las fracciones y se ajustó a pH 7 con Tris HCl 1 M, pH 10. Los grupos se agruparon y esterilizaron por filtración (Millipore Steriflip, 0,22 µm), se midió la DO 280 nm en un espectrómetro ND-1000 (NanoDrop) y se calculó la concentración de proteína basándose en los datos de secuencia. Se analizó la agregación (SEC-MALS) y la pureza (SDS-PAGE, LAL y MS) del eluido. Para la segunda etapa de purificación, si fue necesaria, los grupos de la primera purificación se cargaron en una Spx recién desinfectada (NaOH 0,5 M) (Hi Load 16/60 calidad Superdex 200, 120 ml, GE-Healthcare). La columna se equilibró con PBS y la tanda se realizó con tampón PBS a 1 ml/min, el eluido se recogió en fracciones de 1,2 ml y se analizó como se ha descrito para la primera etapa de purificación.

Anticuerpos de selecciones por afinidad en biblioteca de fagos HuCAL PLATINUM® de Morphosys

Para la selección de anticuerpos que reconocen la P-cadherina humana, se aplicaron múltiples estrategias de selección por afinidad. Se generaron anticuerpos terapéuticos contra la proteína P-cadherina humana mediante la selección de clones que se unían a P-cadherina utilizando como fuente de proteínas variantes de anticuerpos una biblioteca de presentación en fagos disponible en el mercado, la biblioteca HuCAL PLATINUM® de MorphoSys. La biblioteca de fagémidos se basa en el concepto de HuCAL® (Knappik *et al.*, 2000, *J Mol Biol* 296: 57-86) y emplea la tecnología CysDisplay™ para presentar el Fab en la superficie del fago (documento WO01/05950).

Para el aislamiento de anticuerpos anti-P-cadherina se emplearon estrategias de selección por afinidad en fase sólida, fase líquida y células.

Selección por afinidad en fase sólida de P-cadherina recombinante

Antes del proceso de selección de antígeno, se realizó un ELISA de verificación del recubrimiento para determinar la concentración de recubrimiento óptima para el antígeno. Se utilizó proteína P-cadherina recombinante con marcador His en el enfoque de selección por afinidad en fase sólida recubriendo placas Maxisorp™ (Nunc) mediante adsorción pasiva. Se recubrió una cantidad adecuada (dependiendo del número de grupos de subbibliotecas) de pocillos de una placa Maxisorp™ de 96 pocillos (Nunc) con antígeno 125 nM durante una noche a 4 °C. Los pocillos recubiertos se bloquearon con PBS (solución salina tamponada con fosfato)/leche en polvo al 5 %/BSA (seroalbúmina bovina) al 5 %/Tween 20 al 0,1 %/CaCl₂ 1 mM. Para cada selección por afinidad, se bloquearon aproximadamente 50 µL de anticuerpos contra fagos HuCAL PLATINUM® en solución durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Después del procedimiento de bloqueo, se añadió mezcla de fagos prebloqueados a cada pocillo recubierto con antígeno y bloqueado y se incubó durante 2 horas (h) a TA en un agitador de placas de microtitulación (MTP). Posteriormente, el fago unido de forma inespecífica se eliminó mediante varias etapas de lavado con PBS. Para la elución del fago unido específicamente, se añadió DTT (ditiotretitol) 25 mM durante 10 minutos (min) a TA. Los eluatos de DTT se utilizaron para la infección de células de *E. coli* (*Escherichia coli*) TG-F⁺. Después de la infección, las bacterias se sembraron en placas de agar LB (caldo de lisogenia)/Cam (cloranfenicol) y se incubaron durante una noche a 30 °C. Las colonias se rasparon de las placas y se usaron para el rescate de fagos, la amplificación policlonal de clones seleccionados y la producción de fagos. Con el fago purificado se inició la siguiente ronda de selección por afinidad.

La segunda y tercera ronda de selección por afinidad en fase sólida se realizaron según el protocolo de la primera ronda, excepto por las condiciones de lavado más rigurosas.

Subclonación y microexpresión de fragmentos Fab seleccionados

Para facilitar la expresión rápida de Fab soluble, los insertos codificantes de Fab del fago HuCAL PLATINUM® seleccionado se subclonaron del vector de presentación pMORPH®30 en un vector de expresión pMORPH®x11 pMORPH®x11_FH.

Para el cribado y la caracterización iniciales, se lisó un cultivo de una noche de clones de *E. coli* individuales que expresaban Fab usando lisozima 0,5 mg/ml, EDTA 0,8 mM y benzonasa 4 U/µl. Se usaron Fab que contenían lisados de *E. coli* para el cribado mediante ELISA y FACS.

Cribado mediante ELISA

Utilizando el cribado mediante ELISA se identificaron clones de Fab individuales a partir del resultado de la selección por afinidad para la unión al antígeno diana. Los Fabs se prueban utilizando lisados brutos de *E. coli* que contienen Fab.

Para la verificación de la expresión de Fab en los lisados de *E. coli* preparados, se recubrieron placas Maxisorp™ (Nunc) de 384 pocillos con IgG de oveja anti-humana específica para el fragmento Fd diluida 1:1000 en PBS. Después de bloquear las placas con leche desnatada en polvo al 5 % en PBS, se añadieron lisados de *E. coli* que contenían Fab. La unión de Fab se detectó mediante IgG de cabra anti-humana específica para F(ab)₂ conjugada con fosfatasa alcalina (diluida 1:5000) utilizando sustrato de fluorescencia Attophos (Roche, n.º de catálogo 11681982001). Se registró la emisión de fluorescencia a 535 nm con excitación a 430 nm.

Para la identificación de fragmentos Fab de unión al antígeno P-cadherina se recubrieron placas Maxisorp™ (Nunc) de 384 pocillos con antígeno de P-cadherina humana 25 nM mediante adsorción pasiva en PBS. Después de bloquear las placas con leche desnatada en polvo al 5 % en PBS, se añadieron lisados de *E. coli* que contenían Fab. La unión de Fab se detectó mediante IgG de cabra anti-humana específica para F(ab)₂ conjugada con fosfatasa alcalina (diluida 1:5000) utilizando sustrato de fluorescencia Attophos (Roche, n.º de catálogo 11681982001). Se registró la emisión de fluorescencia a 535 nm con excitación a 430 nm.

Cribado mediante FACS (clasificación de células activada por fluorescencia)

En el cribado mediante FACS, los clones Fab individuales que se unen al antígeno expresado en la superficie celular se identifican a partir del resultado de la selección por afinidad. Se analiza la unión celular de los Fabs utilizando lisados brutos de *E. coli* que contienen Fab.

Se transfirieron 50 µl de suspensión celular a una placa nueva de 96 pocillos (lo que dio lugar a 1×10⁵ células/pocillo) y se mezclaron con 50 µl de extractos bacterianos que contenían Fab.

A continuación se incubaron las suspensiones de anticuerpos celulares en hielo durante 1 hora en un agitador. Después de la incubación, las células se centrifugaron y se lavaron dos veces con tampón FACS helado. Después de cada etapa de lavado, las células se centrifugaron y se resuspendieron cuidadosamente.

Se añadió un anticuerpo de detección secundario (IgG de cabra antihumana conjugada con PE; Dianova) y las muestras se incubaron en hielo y posteriormente se lavaron según la incubación de Fab. La intensidad de la fluorescencia se determinó en un instrumento FACSCalibur™.

Expresión y purificación de fragmentos Fab HuCAL®

La expresión de fragmentos Fab se realizó en células de *E. coli* TG1 F-. Los cultivos se agitaron a 30 °C durante 18 h. Las células se recogieron y se rompieron. Los fragmentos Fab marcados con His₆ ("His₆" desvelada como la SEQ ID NO: 130) se aislaron mediante IMAC y filtración en gel y las concentraciones de proteínas se determinaron mediante espectrofotometría UV a 280 nm.

La identidad y pureza de las preparaciones de Fab se determinaron en estado nativo mediante espectrometría de masas (MS).

Análisis de reactividad cruzada

Los Fab purificados se analizaron en ELISA para determinar su unión a proteínas de DEC de P-cadherina humana, de macaco cangrejerón, de rata y de ratón. Para este fin, se recubrieron placas Maxisorp™ (Nunc) de 384 pocillos con antígeno a una concentración de 10 µg/ml en PBS durante una noche a 4 °C. La unión de los Fab se detectó mediante IgG de cabra anti-humana específica para F(ab)₂ conjugada con fosfatasa alcalina (diluida 1:5000) utilizando sustrato de fluorescencia Attophos (Roche, n.º de catálogo 11681982001). Se registró la emisión de fluorescencia a 535 nm con excitación a 430 nm.

Conversión a IgG y expresión de IgG

Con el fin de expresar IgG de longitud completa en células HEK, se subclonaron fragmentos de dominio variable de cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) de vectores de expresión de Fab en vectores pMORPH®_hlg adecuados para IgG1 humana. El sobrenadante del cultivo celular se recogió 10 días después de la transfección. Después de la filtración en condiciones estériles, la solución se sometió a cromatografía de afinidad de proteína A utilizando una estación de manipulación de líquidos. Se realizó intercambio de tampón PBS de Dulbecco 1x (pH 7,2, Invitrogen) y las muestras se filtraron en condiciones estériles (tamaño de poro de 0,2 µm). Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante espectrofotometría UV a 280 nm y la pureza de las IgG se analizó en condiciones desnaturalizantes y reductoras en SDS-PAGE.

Bioensayo

Los anticuerpos anti-P-cadherina obtenidos siguiendo los procesos de selección por afinidad descritos anteriormente se evaluaron en el ensayo ilustrado a continuación:

Ensayo de internalización celular de HCC1954

Para determinar la capacidad de los anticuerpos anti-P-cadherina para experimentar una internalización celular mediada por la diana, se estableció un ensayo de internalización basado en microscopia utilizando la estirpe celular tumoral HCC1954 que expresa P-cadherina.

Las células se resuspendieron en medio de cultivo completo (RPMI-1640 + FCS al 10 % y se sembraron en placas de ensayo microscópicas de 96 pocillos de fondo plano (ViewPlate®-96 F TC, Perkin Elmer, n.º 6005225) a una densidad celular de 5×10^3 células/pocillo en 100 µl y se incubaron a 37 °C y CO₂ al 5 % durante 2 días.

Después de dos días, los anticuerpos HuCAL® (IgG) se diluyeron en PBS hasta las concentraciones deseadas. Se añadieron 100 µl de las soluciones de anticuerpos a las células sembradas y se incubaron durante 2 h. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con reactivo CellFIX 1x (CellFIX™, BD Biosciences, n.º 340181), se lavaron de nuevo dos veces con PBS y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1 %. A continuación, las células se bloquearon con tampón Odyssey 1x (Li-Cor, n.º 927-40000) durante 1 h. Después de la aspiración, las células se tiñeron durante 1 h con Hoechst (tricloruro de bisbencimida H 33342, n.º B2261, Sigma) e IgG de cabra antihumana Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, n.º A-11013). Después de la tinción, las células se lavaron tres veces con PBS y se analizaron utilizando un lector Cellomics ArrayScan VTI HCS (Thermo Fischer Scientific. Para evaluar la concentración de internalización media máxima (valores de CI₅₀), la valoración de IgG se realizó abarcando un intervalo de 10 nM a 2,4 pM en etapas de dilución cuádruples.

Eliminación del sitio de modificación postraduccional (PTM)

Se descubrió que un anticuerpo, NOV169, que se identificó en el ensayo de internalización descrito anteriormente y se vio que se internalizaba eficientemente en células tumorales HCC1954 que expresaban P-cadherina, contenía un único sitio PTM N31S en HCDR1. Para evitar la desamidación, este sitio se convirtió en un sitio N31Q mediante mutagénesis de Kunkel puntual, lo que dio lugar al anticuerpo NOV169N31Q. La fuerza de unión equivalente a la P-cadherina humana recombinante por NOV169N31Q en comparación con el NOV169 parental se confirmó mediante la determinación de KD de forteBIO.

Sumario de anticuerpos

La tabla 1 presenta la información de secuencia relevante para los anticuerpos anti-P-cadherina aislados de la *biblioteca de fagos HuCAL PLATINUM® de Morfosys* y anticuerpos humanizados anti-P-cadherina derivados de hibridomas murinos.

Ejemplo 2: Determinación de la estructura cristalográfica por rayos X de P-cadherina EC1 EC2 humana y de su complejo con el Fab NOV169N31Q

Hasta ahora se desconocía la estructura tridimensional de la P-cadherina humana. Se determinó la estructura cristalina de un fragmento de DEC (dominio extracelular) de P-cadherina humana (los dos primeros dominios de repetición N-terminales de cadherina, o EC1_EC2, aminoácidos 108 a 324, SEQ ID NO: 2, tabla 1) así como su complejo con el fragmento Fab de NOV169N31Q (tabla 1). Como se detalla a continuación, la P-cadherina humana EC1_EC2 se expresó, se replegó, se purificó y se cristalizó. Además, se mezcló la P-cadherina humana EC1_EC2 purificada con el Fab NOV169N31Q para formar un complejo que también se purificó y cristalizó posteriormente. A continuación se empleó la cristalografía de proteínas para generar datos de resolución atómica para la P-cadherina humana EC1_EC2 en estado libre y se unió al Fab NOV169N31Q para definir el epítipo.

Producción de proteínas de P-cadherina humana EC1_EC2 y Fab NOV169N31Q para cristalografía

Las secuencias de aminoácidos de P-cadherina humana EC1_EC2 y Fab NOV169N31Q producidas para cristalografía se muestran en la tabla 3. La construcción de P-cadherina humana EC1_EC2 comprendía los restos 108 a 324 (subrayados) de Pla -cadherina humana (identificador UniProt P22223, SEQ ID NO: 126), junto con restos N-terminales del vector de expresión recombinante (mostrados en letras minúsculas, SEQ ID NO: 127). Para el Fab NOV169N31Q, se muestran las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera, junto con los marcadores de identificación/purificación C-terminales (que se muestran en letras minúsculas, SEQ ID NO: 128 y 129, respectivamente).

Tabla 3: Proteínas utilizadas para la determinación de la estructura cristalina

Construcción	Secuencia de aminoácidos en código de una letra	SEQ ID NO
P-cadherina humana (P22223)		126

ES 2 987 508 T3

Construcción	Secuencia de aminoácidos en código de una letra	SEQ ID NO
	MGLPRGPLASLLLLQVCWLQCAASEPCRAVFREA EVTLEAGGA EQEPGQALGKVFMGCPGQEPALFSTDND DFTVRNGETVQERRS LKERNPLKIFPSKRILRRHKRDWV VAPISVPENGKGPFQRLN QLKSNKDRD TKIFYSITGPGADSPPEGVFAVEKETGWLLL NKPLDREEIAKYELFGH AVSENGASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKF TQD TFRGSVLEGVLPGT SVMQVTATDEDDAIYTYNGVVAYS IH SQEPKDPHDL MFTIHRSTGTISVISSGLDREKVPEYTLTIQAT DMDGDGSTTTAVAVVEILDANDNAPMFDPQKYEAHV PENAVGH EVQRLTVTDLDAPNSPAWRATY LIMGGDDGDHFTITTHPESNQ GILTTRKGLDFEAKNQHTLYVEVTNEAPFVLKLP TSTATIVVH VEDVNEAPVFVPPSKVVEVQEGIPTGEPVCVYTAEDPDKENQK ISYRILRDPAGWLAMPDPSGQVTAVGTL DREDEQFVRNNIYEV MVLAMDNGSPPTTGTGTL LLLTLIDVNDHGPVPEPRQITICNQS PVRQVLNITDKDLS PHTSPFQAQLTDDSDIYWTAEVNEEGDTV VLSLKKFLKQD TYDVHLSLS DHGNKEQLTVIRATVCDCHGHE TCPGPWKGGF ILPVLGAVLALLFLLLV LLLLVRKKRKIKEPLL LPEDDTRDNV FYYGEEGGGEEDQDYDITQLHRGLEARPEVVL R NDVAPTIIPTPMYRPRPANPDEIGNFIIENLKAANTDPTAPPY DTLLVFDYEGSGSDAASLSSLTSSASDQDQDYDYLNEWGSRFK KLADMYGGGEDD	
P-cadherina humana		127
EC1_EC2	gpDWV VAPISVPENGKGPFQRLNQLKSNKDRD TKIFYSITGP GADSPPEGVFAVEKETGWLLL NKPLDREEIAKYELFGH AVSEN GASVEDPMNISIIVTDQNDHKPKFTQD TFRGSVLEGVLPGT SV MQVTATDEDDAIYTYNGVVAYS IHSQEPKDPHDL MFTIHRSTG TISVISSGLDREKVPEYTLTIQATDMDGDGSTTTAVAVVEILD ANDN	
NOV169N31Q		128
Cadena pesada de Fab	QVQLQQSGPGLVKPSQ TSLTCAISGDSVSSQSAAWN WIRQSP SRGLEWLGRIYYRSK WYNDYALSVKSRITINPDTSKNQFSLQL NSVTPEDTAVYYCARGEGY GREGFAIWGQGLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG	
	VHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSEFdyk ddddkgaphhhhh	
NOV169N31Q		129
Cadena ligera de Fab	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTISNTLAWYQQKPGKA PKLLIYAASN LQSGVPSRFSGSGSGTDFLT ISSLQPEDFATY YCQQYLSWFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEA	

La P-cadherina humana EC1_EC2 con un marcador de hexahistidina N-terminal (SEQ ID NO: 130) seguido de un sitio de escisión PreScission se clonó y expresó en *E. coli* BL21 (DE3) Star (Invitrogen) con un vector pET28. Después de la inducción durante una noche con IPTG a 18 °C, se recogieron células (67 g) y se lisaron con una prensa francesa en 700 ml de TRIS 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, glicerol al 10 %, TCEP 2 mM y 14 comprimidos de cóctel inhibidor de proteasa cOmplete sin EDTA (Roche). Después de la centrifugación (35 min a 18.000 rpm con rotor SS34), el sobrenadante se filtró en condiciones estériles (0,45 µm) y se cargó en una columna de cromatografía de quelación de metales en bruto FF (5 ml, GE Healthcare) preequilibrada con tampón A (TRIS 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, glicerol al 10 %). La columna se lavó primero con el tampón de equilibrado y después con el tampón A que incluía imidazol 25 mM, seguido de elución con un gradiente de imidazol de 25 mM a 500 mM. La proteína eluida (36 mg) se escindió después usando proteasa PreScission (10 µg por mg) durante la diálisis de una noche frente a TRIS 50 mM, pH 8,0. Después de la filtración (0,22 µm), la muestra se cargó en una columna de cromatografía de intercambio aniónico MonoQ (GE Healthcare) preequilibrada con TRIS 50 mM, pH 8,0 y se eluyó con un gradiente de NaCl de 0,0 M a 1,0 M. El pico principal que contenía P-cadherina EC1_EC2 (25,6 mg) se recogió y analizó mediante SDS-PAGE y HPLC. A continuación, se volvió a cargar el conjunto de fracciones en la columna de cromatografía de quelación de metales en bruto FF (5 ml, GE Healthcare) preequilibrada con TRIS 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, glicerol al 10 % como antes. La proteína P-cadherina EC1_EC2 se recuperó en el flujo continuo y se analizó mediante HPLC y LC-MS. Los análisis de LC-MS mostraron el peso molecular esperado (23.837 Da).

El Fab NOV169N31Q se expresó a escala de 1 litro en *E. coli*. En primer lugar, el plásmido que codifica el fragmento Fab se transformó en células *E. coli* TG1F⁻ químicamente competentes. Después del cultivo de las bacterias durante una noche en una placa de LB/Agar/glucosa al 1 %/cloranfenicol con 34 µg/ml a 37 °C, se usó una colonia para inocular un precultivo de 6 ml (2xYT/glucosa al 1,0 %/cloranfenicol con 34 µg/ml). El cultivo se incubó durante una noche a 30 °C, agitando a 220 rpm. Al día siguiente, el precultivo se transfirió a 1 litro de cultivo de expresión (2xYT/glucosa al 0,1 %/cloranfenicol con 34 µg/ml). El cultivo de expresión se incubó a 30 °C, agitando a 220 rpm hasta que se alcanzó una DO_{600nm} de 0,6-0,8. La expresión se indujo mediante la adición de IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM. La expresión se llevó a cabo durante una noche a 25 °C y 220 rpm. Al día siguiente, las células se sedimentaron y congelaron a -80 °C.

El fragmento Fab se purificó en 2 etapas utilizando un protocolo automático en el sistema AEKTA Express (programa informático: Unicom_v5.11). El sedimento bacteriano se resuspendió primero en 40 ml de tampón de lisis (fosfato de Na 200 mM, pH 7,4, NaCl 0,5 M, lisozima al 0,1 %, MgCl₂ 2 mM, 10 U/ml de benzonasa, 1 comprimido/50 ml de inhibidor de proteasa sin EDTA cOmplete) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Los residuos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 16.000 g durante 30 min. El sobrenadante que contenía Fab se pasó a través de filtros de jeringa de 0,2 µm (Pall, n.º PN4525) y se cargó en el sistema preequilibrado con tampón de ejecución (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 10 mM, pH 7,4). La primera etapa de purificación se realizó en una columna HiTrap HP de 1 ml (GE Healthcare). La columna se lavó con tampón de ejecución y los fragmentos Fab marcados con His₆ ("His₆" desvelada como la SEQ ID NO: 130) se eluyeron con el tampón de elución (fosfato Na 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 250 mM, pH 7,4). La fracción pico se aplicó automáticamente a la columna de filtración en gel (HiLoad 16/60 Superdex 75; GE Healthcare). El fragmento Fab purificado se eluyó en PBS. La concentración del fragmento Fab se determinó mediante mediciones de UV_{280nm} y aplicando la ecuación de Lambert-Beer, utilizando el coeficiente de extinción estimado a partir de la secuencia de aminoácidos.

45 **Cristalización y determinación de la estructura de la P-cadherina humana EC1_EC2**

Se dializó P-cadherina humana EC1_EC2 frente a Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 25 mM, se concentró a 15 mg/ml y se exploró para determinar su cristalización a 20 °C.

Los cristales se cultivaron en placas SD2 de 96 pocillos mediante difusión de vapor de gota sentada. En detalle, se mezclaron 0,2 µl de proteína con 0,2 µl de solución de depósito y la gota se equilibró frente a 80 µl de la misma solución de depósito a 20 °C. Se obtuvieron cristales adecuados para el análisis de difracción de rayos X con una solución de depósito hecha de HEPES 0,085 M, pH 7,5, NaCl 3655 M y glicerol al 15 %.

Para la recopilación de datos, se montó un cristal de P-cadherina humana EC1_EC2 en un cryo-loop y se enfrió instantáneamente de forma directa en nitrógeno líquido. Los datos de difracción se recogieron en la línea de luz X10SA (PX-II) de la Swiss Light Source (Instituto Paul Scherrer, Suiza), con un detector de píxeles Pilatus y rayos X de longitud de onda de 0,99999 Å. En total, se registraron 720 imágenes con una oscilación de 0,25 grados cada una a una distancia del cristal al detector de 200 mm. Los datos se procesaron y aumentaron de escala a una resolución de 1,40 Å utilizando XDS (Kabsch (1993) *J. Appl. Crystallogr.* 26:795-800) como se implementa en APRV-INDEX (Kroemer, Dreyer, Wendt (2004) *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* 60:1679-1682). El cristal estaba en el grupo espacial C2 con dimensiones de celda a= 120,89 Å, b= 76,52 Å, c= 46,21 Å, alfa=90°, beta= 107,79°, gamma=90°. La estructura de la P-cadherina humana EC1_EC2 se resolvió mediante reemplazo molecular utilizando el programa Phaser (McCoy *et al.*, (2007) *J. Appl. Cryst.* 40:658-674) y entrada 1L3W de la PDB (*X. Laevis* C-cadherina, 3,08 Å, 55 % de identidad de secuencia). El modelo final se construyó en COOT (Emsley *et al.*, (2010) *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.*

66:486-501) y se refinó con Buster (Global Phasing, LTD) hasta valores de R_{trabajo} y R_{libre} de 19,8 % y 21,3 %, respectivamente, con un valor rmsd de 0,010 Å y 1,13° para longitudes de enlace y ángulos de enlace, respectivamente.

Estructura de P-cadherina humana EC1_EC2

La estructura cristalina de la P-cadherina humana EC1_EC2 (restos de aminoácidos 108 a 322) se muestra en la figura 1. Ambos dominios de cadherina tenían una densidad electrónica bien definida y mostraron el pliegue general esperado. Se observaron tres iones de calcio en la interfaz del dominio.

Se ha propuesto que el dominio DEC de las cadherinas desempeña una función en la arquitectura extracelular de las uniones adherentes, que controlan la adhesión intercelular. El ensamblaje de la unión implica interacciones homotípicas tanto en *trans* como en *cis* entre los ectodominios de grupos de cadherina (Boggon *et al.*, (2002) *Science* 296:1308-1313; Harrison *et al.*, (2011) *Structure* 19:244-256). La interacción homotípica en *trans* implica el intercambio de Trp N-terminal ("dímero de cadena intercambiada") entre los dominios EC1 de dos moléculas de cadherina en orientación opuesta (presentadas por dos células diferentes). Por el contrario, en la interacción homotípica en *cis* participa el dominio de cadherina extracelular N-terminal (EC1) de una molécula y el segundo dominio (EC2) de otra molécula en la misma orientación. Se cree que las interacciones en *trans* son mucho más fuertes que las interacciones en *cis*. Mientras las interacciones en *trans* forman la base molecular de la adhesión intercelular, se cree que las interacciones en *cis* promueven la adhesión celular mediante agrupación molecular.

La estructura cristalina del fragmento EC1_EC2 de P-cadherina humana mostró que el segmento N-terminal que participaba en las interacciones homotípicas en *trans* a través del intercambio de Trp no participaba en tales interacciones en el cristal y estaba ligado a su propio dominio. Además, un análisis del empaquetamiento cristalino reveló que una de las moléculas de P-cadherina EC1_EC2 relacionadas por simetría estaba produciendo interacciones homotípicas en *cis* muy similares a las ya comunicadas para otras cadherinas, lo que demuestra que la cristalización estaba, en este caso, impulsada por interacciones homotípicas en *cis*.

Cristalización y determinación de la estructura del complejo de Fab NOV169N31Q

El complejo de P-cadherina humana EC1_EC2 con el Fab NOV169N31Q se preparó mezclando la P-cadherina humana EC1_EC2 purificada y el Fab NOV169N31Q en una relación molar de 1,5:1,0 (concentración medida por HPLC) y purificando el complejo en una cromatografía de exclusión por tamaño Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada en Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, con 2 comprimidos de cóctel inhibidor de proteasa sin EDTA cOmplete (Roche). Las fracciones de los picos se analizaron mediante SDS-PAGE y LCMS. Las fracciones que contenían el complejo de P-cadherina humana EC1_EC2/Fab NOV169N31Q se concentraron hasta aproximadamente 12 mg/ml, se añadió CaCl₂ hasta una concentración final de 5 mM y la muestra se exploró para determinar su cristalización a 20 °C.

Los cristales se cultivaron en placas SD2 de 96 pocillos mediante difusión de vapor de gota sentada. En detalle, se mezclaron 0,2 µl de proteína con 0,2 µl de solución de depósito y la gota se equilibró frente a 80 µl de la misma solución de depósito a 20 °C. Se obtuvieron cristales adecuados para el análisis de difracción de rayos X con una solución de depósito hecha de acetato de calcio 0,2 M, PEG 8000 al 10 % (p/v), MES 0,1 M, pH 6,5.

Antes de la recogida de datos, se transfirió brevemente un cristal de P-cadherina humana EC1_EC2/Fab NOV169N31Q a una mezcla 1:1 de la solución de depósito con PEG 8000 al 20 %, glicerol al 30 % y se enfrió de forma ultrarrápida en nitrógeno líquido.

Los datos de difracción se recogieron en la línea de luz X10SA (PX-II) de la Swiss Light Source (Instituto Paul Scherrer, Suiza), con un detector de píxeles Pilatus y rayos X de longitud de onda de 0,99999 Å. En total, se registraron 720 imágenes con una oscilación de 0,25 grados cada una a una distancia del cristal al detector de 340 mm. Los datos se procesaron y aumentaron de escala a una resolución de 2,10 Å utilizando XDS (Kabsch (1993) *J. Appl. Crystallogr.* 26:795-800) como se implementa en APRV-INDEX (Kroemer, Dreyer, Wendt (2004) *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* 60:1679-1682). El cristal estaba en el grupo espacial P2₁2₁2 con dimensiones de celda $a = 172,69$ Å, $b = 77,79$ Å, $c = 133,41$ Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90,0^\circ$, $\gamma = 90^\circ$. La estructura de P-cadherina humana EC1_EC2/Fab NOV169N31Q se resolvió mediante reemplazo molecular utilizando Phaser (McCoy *et al.*, (2007) *J. Appl. Cryst.* 40:658-674). El modelo final se construyó en COOT (Emsley *et al.*, (2010) *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* 66:486-501) y se refinó con Buster (Global Phasing, LTD) hasta valores de R_{trabajo} y R_{libre} de 19,2 % y 22,1 %, respectivamente, con un valor rmsd de 0,010 Å y 1,18° para longitudes de enlace y ángulos de enlace, respectivamente. Los restos de P-cadherina humana EC1_EC2 que contienen átomos a una distancia de 4,0 Å o inferior de cualquier átomo en Fab NOV169N31Q se identificaron mediante el programa Ncont del conjunto de programas CCP4 (Collaborative Computing Project, Number 4 (1994) *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* 50:760-763) y se enumeran en las tablas 4 y 5. El programa AREAIMOL del conjunto de programas CCP4 identificó los restos de P-cadherina humana EC1_EC2 que se vuelven menos accesibles al disolvente tras la unión del anticuerpo NOV169N31Q.

Epítipo de P-cadherina ECI EC2 para NOV169N31Q

La estructura cristalina del complejo de P-cadherina EC1_EC2/Fab NOV169N31Q se usó para identificar el epítipo de P-cadherina EC1_EC2 para NOV169N31Q. El análisis de rayos X muestra que NOV169N31Q se une al dominio EC1 (dominio de repetición de cadherina N-terminal) de la cadherina P humana (figura 2). Hay dos copias del complejo Fab NOV169N31Q - P-cadherina humana EC1_EC2 en la unidad asimétrica del cristal (una unidad asimétrica contiene toda la información estructural que se necesita para reproducir todo el cristal mediante la aplicación de operadores de simetría cristalográfica). Ambas copias comparten restos casi idénticos en contacto con Fab NOV169N31Q excepto por pequeñas variaciones debidas al empaquetamiento cristalino.

La superficie de interacción de la P-cadherina humana EC1_EC2 con el Fab NOV169N31Q está formada por dos secuencias discontinuas (es decir, no contiguas), comprendidas completamente dentro del dominio EC1 de P-cadherina y que abarcan los restos 123 a 127 y los restos 151 a 177 (figura 3). Entre ellos, los restos 124 y 125 y los restos 151 a 172 contribuyen a contactos intermoleculares directos de menos de 4,0 Å (entre átomos distintos de hidrógeno), como se detalla en las tablas 4 y 5 y se muestra en la figura 3. Estos restos forman la superficie tridimensional que reconoce el Fab NOV169N31Q (figura 4).

Tabla 4. Interacciones entre la P-cadherina humana EC1_EC2 y la cadena pesada (H) del Fab NOV169N31Q. Los restos de P-cadherina se numeran basándose en P22223 (SEQ ID NO: 126). Los restos de cadena pesada de Fab se numeran en función de su secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 128). Los restos de P-cadherina que se muestran tienen al menos un átomo a una distancia de 4,0 Å o inferior de un átomo en el Fab NOV169N31Q.

Restos de P-cadherina humana (SEQ ID NO: 126)		Restos de Fab NOV169N31Q (SEQ ID NO: 128)		
Aminoácido	Número	Aminoácido	Número	Cadena
Phe	124	Leu	65	H
Asp	151	Tyr	105	H
Pro	153	Tyr	54	H
		Arg	56	H
		Tyr	60	H
		Tyr	105	H
Pro	154	Tyr	54	H
Glu	155	Arg	52	H
		Tyr	54	H
		Tyr	105	H
		Arg	107	H
Gly	156	Arg	107	H
Pro	172	Leu	65	H

Tabla 5. Interacciones entre la P-cadherina humana EC1_EC2 y la cadena ligera (L) del Fab NOV169N31Q. Los restos de P-cadherina se numeran basándose en P22223 (SEQ ID NO: 126). Los restos de cadena ligera de Fab se numeran en función de su secuencia de aminoácidos lineal (SEQ ID NO: 129). Los restos de P-cadherina que se muestran tienen al menos un átomo a una distancia de 4,0 Å o inferior de un átomo en el Fab NOV169N31Q.

Restos de P-cadherina humana (SEQ ID NO: 126)		Restos de Fab NOV169N31Q (SEQ ID NO: 129)		
Resto	Número	Resto	Número	Cadena
Phe	124	Asp	1	L
Pro	125	Ile	2	L
		Gln	27	L
		Ser	93	L
Glu	155	Trp	94	L
Gly	156	Trp	94	L
Ala	159	Leu	92	L
Val	160	Leu	92	L
Glu	161	Gln	27	L
		Thr	28	L
Lys	162	Ser	30	L

Restos de P-cadherina humana (SEQ ID NO: 126)		Restos de Fab NOV169N31Q (SEQ ID NO: 129)		
Resto	Número	Resto	Número	Cadena
Glu	163	Gly	68	L
Leu	168	Leu	92	L
Asn	170	Ser	93	L
		Trp	94	L
Lys	171	Trp	94	L

A diferencia de los otros dominios extracelulares de repetición de cadherina de la P-cadherina humana, el dominio EC1 no alberga ningún sitio de glucosilación conocido unido a N u O. La unión de NOV169N31Q a P-cadherina es, por tanto, independiente de la glucosilación. También cabe señalar que la secuencia de aminoácidos del dominio EC1 de P-cadherina humana está completamente conservada en la P-cadherina de macaco cangrejero (*Macaca fascicular*) (figura 5). Por lo tanto, el epítipo de P-cadherina reconocido por NOV169N31Q está completamente conservado en esta especie de mono utilizada en estudios toxicológicos.

Glu155 de la P-cadherina humana EC1_EC2 es el resto epitópico que realiza más contactos con el Fab NOV169N31Q (véase la figura 3). Resulta interesante que el Glu155 se encuentra dentro de una inserción no conservada que se encuentra únicamente en las cadherinas humanas 1 a 4, como lo muestra una alineación de secuencia múltiple de todas las cadherinas humanas (figura 6). Como el propio Glu155 no se conserva en las cadherinas humanas 1, 2 y 4, se espera que NOV169N31Q muestre una alta selectividad hacia la cadherina-3 humana (que también se conoce como P-cadherina humana).

Como ya se ha mencionado anteriormente, las cadherinas desempeñan una función importante en el mecanismo molecular de la adhesión intercelular, que implica interacciones homotípicas tanto fuertes en *trans* como débiles en *cis* entre los ectodominios de los grupos de cadherinas. (Boggon *et al.*, (2002) *Science* 296:1308-1313; Harrison *et al.*, (2011) *Structure* 19:244-256). Según la estructura cristalina del complejo de P-cadherina humana EC1_EC2/Fab NOV169N31Q, parece que el epítipo de unión para NOV169N31Q se solapa parcialmente con la región superficial del dominio EC1 implicado en interacciones homotípicas en *cis*, pero no con la región N-terminal que participa en interacciones homotípicas en *trans* (intercelulares). Como consecuencia, el NOV169N31Q no compete con interacciones fuertes en *trans* por la unión a cadherina y, por lo tanto, es más probable que tenga un acceso más fácil a su epítipo de unión. Además, no se espera que la unión de este anticuerpo a su antígeno diana rompa completamente la adhesión intercelular, ya que se conservan las interacciones homotípicas en *trans*.

Ejemplo 3: Generación y caracterización de conjugados de fármacos y anticuerpos contra P-cadherina

Preparación de los conjugados de DM1 mediante un proceso de una etapa

Se diafiltraron anticuerpos contra P-cadherina en un tampón de reacción (fosfato de potasio 15 mM, EDTA 2 mM, pH 7,6) mediante filtración de flujo tangencial (TFF n.º 1) antes del inicio de la reacción de conjugación. Posteriormente, se mezclaron anticuerpos (5,0 mg/ml) con DM1 (exceso molar de 5,6 veces con respecto a la cantidad de anticuerpo) y después con SMCC (exceso molar de 4,7 veces con respecto a la cantidad de anticuerpo). La reacción se realizó a 20 °C en tampón de fosfato potásico 15 mM (pH 7,6) que contenía EDTA 2 mM y DMA al 10 % durante aproximadamente 16 horas. La reacción se detuvo añadiendo ácido acético 1 M para ajustar el pH a 5,50. Después del ajuste del pH, la mezcla de reacción se filtró a través de un filtro de PVDF multicapa (0,45/0,22 µm) y se purificó y diafiltró en un tampón de histidina 20 mM (pH 5,6) que contenía sacarosa al 8,22 % usando filtración de flujo tangencial (TFF n.º 2). Los parámetros del instrumento para la filtración de flujo tangencial se enumeran en la tabla 6 a continuación.

Tabla 6. Parámetros del instrumento para la filtración de flujo tangencial

Parámetro de TFF	Punto de ajuste de la TFF n.º 1	Punto de ajuste de la TFF n.º 2
Concentración global (Cb - g/l)	20	20
PTM (psi)	12-18	12-18
Caudal de alimentación (LMH)	324	324
Carga de membrana (g/m2)	110 - 150	110 - 150
Diavolumenes	10	14

Parámetro de TFF	Punto de ajuste de la TFF n.º 1	Punto de ajuste de la TFF n.º 2
Tampón de diafiltración	Fosfato de potasio 15 mM, EDTA 2 mM, pH 7,6	Histidina 20 mM, sacarosa al 8,22 %, pH 5,6
Temperatura (°C)	TA (20 - 25)	TA (20 - 25)

5 Los conjugados obtenidos del proceso descrito anteriormente se analizaron mediante: espectroscopia UV para la carga de agentes citotóxicos (relación maitansinoide/anticuerpo, RMA); SEC-HPLC para la determinación del monómero conjugado; y HPLC de fase inversa o HPLC de fase protegida hidrófoba (Hisep) para el porcentaje de maitansinoide libre. Los datos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Propiedades del CAF para P-cadherina preparado mediante un proceso de una etapa

Muestra	RMA	Monómero (%)	Maitansinoide libre total (%)
NOV169N31Q-MCC-DM1	3,7	99,1	0,6

10

Preparación de conjugados de DM1 mediante un proceso in situ

15

20

Los conjugados de la presente invención también se pueden preparar mediante un proceso *in situ* según los siguientes procedimientos. Se conjugaron anticuerpos contra P-cadherina con la DM1 utilizando el conector de sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC). Se prepararon soluciones madre de DM1 y conector heterobifuncional sulfo-SMCC en DMA. Se mezclaron entre sí sulfo-SMCC y DM1 tiol para que reaccionaran durante 10 minutos a 25 °C en DMA que contenía 40 % v/v de tampón de succinato acuoso 50 mM, EDTA 2 mM, pH 5,0, en una relación de DM1 con respecto a conector de 1,3:1 equivalente molar y una concentración final de DM1 de 1,95 mM. A continuación, se hizo reaccionar el anticuerpo con una alícuota de la reacción para dar una relación de equivalente molar de SMCC con respecto a Ab de aproximadamente 6,5:1 en condiciones de conjugación finales de 2,5 mg/ml de Ab en EPPS 50 mM, pH 8,0 y DMA al 10 % (v/v). Después de aproximadamente 18 horas a 25 °C, la mezcla de reacción de conjugación se purificó usando una columna SEPHADEX™ G25 equilibrada con succinato 10 mM, glicina 250 mM, sacarosa al 0,5 %, Tween 20 al 0,01 %, pH 5,5.

25

Tabla 8. Propiedades de los anticuerpos conjugados con DM1

Nombre del clon	Exceso de conector	RMA	Monómero (%)	Rendimiento (%)	Fármaco libre (%)
NOV169N31Q	7,0	3,15	99,0	76	<2
NEG0012	6,8	4,07	97,8	56	<2
NEG0013	5,5	3,29	94,6	70	<2
NEG0016	6,8	3,44	97,3	70	<2
NEG0064	5,3	3,91	98,0	76	<2
NEG0067	5,1	3,63	97,8	79	<2

Preparación de CAF con el conector de SPDB

30

35

Se modificaron anticuerpos contra P-cadherina (8 mg/ml) con N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB, exceso molar de 4,0-4,1 veces) durante 120 minutos a 25 °C en tampón de EPPS 60 mM (pH 8,5) que contenía fosfato de potasio 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM y DMA al 5 %. El Ab modificado sin purificación se conjugó posteriormente con DM4 (exceso molar de 1,5 veces sobre el conector no unido) a una concentración final de anticuerpo modificado de 4 mg/ml en tampón de EPPS 60 mM (pH 8,5) que contenía fosfato potásico 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 2 mM y DMA al 5 % durante 18 horas a 25 °C. La mezcla de reacción de conjugación se purificó usando una columna SEPHADEX™ G25 equilibrada y eluida con succinato 10 mM, glicina 250 mM, sacarosa al 0,5 %, Tween 20 al 0,01 %, pH 5,5.

Tabla 9. Propiedades de los anticuerpos conjugados con DM4

Nombre del clon	Exceso de conector	RMA	Monómero (%)	Rendimiento (%)	Fármaco libre (%)
2P10	4,0	3,18	95,6	93	<0,5%
1G12	4,1	3,60	96,8	95	<0,5%

Nombre del clon	Exceso de conector	RMA	Monómero (%)	Rendimiento (%)	Fármaco libre (%)
3D21	4,0	3,42	97,0	96	<0,5%

Preparación de CAF con el CX1-1 Se mezcló el anticuerpo conector NEG0067 (5,0 mg/ml) con DM1 (exceso molar de 7,4 veces con respecto a la cantidad de anticuerpo) y después con CX1-1 (exceso de 5,7 veces con respecto a la cantidad de anticuerpo). La reacción se realizó a 25 °C en tampón de EPPS [4-(2-hidroxietil)-1-piperazinapropanosulfónico] 50 mM (pH 8,0) que contenía EDTA 2 mM y DMA al 5 % durante aproximadamente 16 horas. La mezcla de reacción se purificó después usando una columna SEPHADEX™ G25 equilibrada y se eluyó en succinato 10 mM, glicina 250 mM, sacarosa al 0,5 %, Tween 20 al 0,01 %, pH 5,5

Tabla 10. Propiedades de NEG0067 conjugado con CX1-1/DM1

Nombre del clon	Exceso de conector	RMA	Monómero (%)	Rendimiento (%)	Fármaco libre (%)
NEG0067	5,7	3,47	99,4	79	0,7

Ejemplo 4: Afinidad por la P-cadherina de los anticuerpos y CAF contra P-cadherina

Se determinó la afinidad de diversos anticuerpos y conjugados de anticuerpos y fármacos (en formato Ab-MCC-DM1) por la P-cadherina y sus ortólogos de especies utilizando tecnología SPR mediante un instrumento Biacore® T100 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) o un instrumento Biacore® 2000 (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) que utiliza chips sensores CM5.

En resumen, se utilizó HBS-P⁺ (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 al 0,05 %) complementado con tampón de bloqueo Odyssey® al 2 % (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE) como tampón de ejecución para todos los experimentos en el instrumento Biacore® T100. Se utilizó HBS-P (HEPES 0,01 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, tensioactivo P20 al 0,005 %) complementado con tampón de bloqueo Odyssey® al 2 % como tampón de ejecución para todos los experimentos en el instrumento Biacore® 2000. Se midieron el nivel de inmovilización y las interacciones con el analito por unidad de respuesta (UR). Se realizaron experimentos piloto para probar y confirmar la viabilidad de la inmovilización de la proteína A (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) y la captura de los anticuerpos de prueba.

Para las mediciones cinéticas, se realizaron experimentos en los que los anticuerpos se capturaron en la superficie del chip sensor a través de la proteína A inmovilizada y se determinó la capacidad de las proteínas P-cadherinas para unirse en solución libre. En resumen, se inmovilizaron 28 µg/ml de proteína A a pH 4,5 en un chip sensor CM5 mediante acoplamiento de amina a un caudal de 10 µl/minuto en dos celdas de flujo hasta alcanzar 2300-3300 UR. A continuación, se inyectaron 0,01-0,25 µg/ml de anticuerpos de ensayo a 5 µl/min durante 3 minutos. Los niveles capturados de los anticuerpos se mantuvieron en general por debajo de 400 UR. Posteriormente, se diluyeron 6,25-100 nM de DEC de P-cadherina en una serie de diluciones dobles y se inyectaron a un caudal de 40 µl/min durante 2-4 minutos sobre celdas de flujo de referencia y de ensayo. La tabla 11 de los DEC analizados se enumera a continuación. La disociación de la unión se siguió durante 5 min. Después de cada ciclo de inyección, la superficie del chip se regeneró con PBS/guanidina HCl 6 M, pH 7,4 a 100 µl/min durante 45 segundos. Todos los experimentos se realizaron a 25 °C y los datos de respuesta se ajustaron globalmente con un modelo de interacción simple 1:1 usando el programa informático Biacore T100 Evaluation versión 2.0.3 (GE Healthcare) para obtener estimaciones de la tasa de asociación (k_a), tasa de disociación (k_d) y afinidad (K_D) en el instrumento Biacore® T100. Los experimentos que se realizaron en el instrumento Biacore® 2000 se equiparon globalmente con un modelo de interacción simple 1:1 usando el programa informático Scrubber 2® versión 2.0b (BioLogic Software) para obtener estimaciones de la tasa de asociación (k_a), tasa de disociación (k_d) y afinidad (K_D)

Tabla 11: Isotipo y fuente de DEC de P-cadherina utilizados en el ensayo de afinidad

Isotipo de DEC	Marcador	Fuente
Humano	His 6x C-terminal (SEQ ID NO: 130)	NVS
Cyno_1	His 6x C-terminal (SEQ ID NO: 130)	NVS
Cyno_2	His 6x C-terminal (SEQ ID NO: 130)	NVS
Ratón	His 6x C-terminal (SEQ ID NO: 130)	NVS
Rata	His 6x C-terminal (SEQ ID NO: 130)	NVS

La tabla 12 enumera la unión al dominio y la afinidad de diversos anticuerpos contra P-cadherina desvelados en la tabla 1. Como se muestra en la tabla, los anticuerpos NOV169N31Q, NEG0012, NEG0013, NEG0016, NEG0064 y NEG0067 reaccionaron con la P-cadherina humana a nivel nanomolar y tienen afinidades similares por los probados contra el DEC de P-cadherina de macaco cangrejero. Todos los anticuerpos reaccionaron de forma cruzada con el de rata excepto NOV169N31Q.

Tabla 12. Estimaciones de afinidad de anticuerpos anti-P-cadherina y CAF obtenidos contra P-cadherina humana y ortólogos de especies

		Estimación de la afinidad (K _D)			
ID del anticuerpo		P-cad humana (nM)	P-cad Cyno_1 (nM)	P-cad Cyno_2 (nM)	P-cad de rata (nM)
NOV169N31Q	Desnudo	33,3	36,8	44,5	Sin unión
	CAF	27	27,5	47,1	ND
NEG0012	Desnudo	44,8	30,2	23	44,5
	CAF	31,3	39	37,1	ND
NEG0013	Desnudo	37,3	21,1	17,2	37
	CAF	36	ND	ND	ND
NEG0016	Desnudo	60	26,9	33,6	60,1
	CAF	54	ND	ND	ND
NEG0064	Desnudo	3,66	3,46	2,9	8,99
	CAF	4,4	6	6,4	13,3
NEG0067	Desnudo	3,21	3,27	3,53	10,3
	CAF	6	ND	ND	ND
ND = no determinado					

Ejemplo 5: Selectividad de NOV169N31Q-MCC-DM1/NOV169N31Q en ensayos bioquímicos

Para examinar el potencial de reactividad cruzada inespecífica de NOV169N31Q-MCC-DM1, se evaluó la unión de NOV169N31Q a dos miembros de la familia de cadherinas clásicas estrechamente relacionados con el mayor grado de identidad de secuencia de aminoácidos en sus DEC correspondientes: E-cadherina (CDH1) o N-cadherina (CDH2).

Para evaluar la especificidad de la unión a P-cadherina frente a E-cadherina y N-cadherina, las placas Maxisorp de 384 pocillos se incubaron durante una noche a 4 °C con DEC de E-cadherina o N-cadherina humana recombinante y se analizaron fragmentos Fab usando un formato de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Tras el lavado, las placas se bloquearon durante 2 h con leche desnatada al 5 % en PBST 1x. Se añadieron lisados de *E. coli* que contenían Fab y se permitió la unión durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Para detectar los fragmentos Fab unidos, las placas se lavaron 5 veces con TBST y se añadió el F(ab')₂ anti IgG humana de AP a una dilución de 1/2500. Tras 1 h a TA, las placas se lavaron 5 veces con TBST y se añadió el sustrato AttoPhos según las especificaciones del fabricante. Las placas se leyeron en un lector de ELISA 5 minutos después de añadir el sustrato.

Utilizando la metodología ELISA, no se detectó ninguna unión significativa a la E-cadherina ni la N-cadherina humana para el anticuerpo anti-P-cadherina candidato NOV169N31Q.

Ejemplo 6: Selectividad de NOV169N31Q-MCC-DM1/NOV169N31Q en ensayos bioquímicos

Para examinar el potencial de reactividad cruzada inespecífica de NOV169N31Q-MCC-DM1, se evaluó la unión de NOV169N31Q a dos miembros de la familia de cadherinas clásicas estrechamente relacionados con el mayor grado de identidad de secuencia de aminoácidos en sus DEC correspondientes: E-cadherina (CDH1) o N-cadherina (CDH2).

Para evaluar la especificidad de la unión a P-cadherina frente a E-cadherina y N-cadherina, las placas Maxisorp de 384 pocillos se incubaron durante una noche a 4 °C con DEC de E-cadherina o N-cadherina humana recombinante y se analizaron fragmentos Fab usando un formato de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Tras el lavado, las placas se bloquearon durante 2 h con leche desnatada al 5 % en PBST 1x. Se añadieron lisados de *E. coli* que contenían Fab y se permitió la unión durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Para detectar los fragmentos Fab unidos, las placas se lavaron 5 veces con TBST y se añadió el F(ab')₂ anti IgG humana de AP a una dilución de 1/2500. Tras 1 h

a TA, las placas se lavaron 5 veces con TBST y se añadió el sustrato AttoPhos según las especificaciones del fabricante. Las placas se leyeron en un lector de ELISA 5 minutos después de añadir el sustrato.

Utilizando la metodología ELISA, no se detectó ninguna unión significativa a la E-cadherina ni la N-cadherina humana para el anticuerpo anti-P-cadherina candidato NOV169N31Q.

Ejemplo 7: Evaluación de la repercusión del NOV169N31Q en la función de la P-cadherina

Se realizó un estudio para evaluar la capacidad del anticuerpo anti-P-cadherina NOV169N31Q (un componente del conjugado de anticuerpo y fármaco NOV169N31Q-MCC-DM1) para ejercer un efecto funcional sobre la P-cadherina en un ensayo celular. La P-cadherina es una molécula de adhesión celular homotípica expresada en la superficie celular de las células cancerosas, por lo que se empleó un ensayo de integridad de esferoides utilizando células HCT116 positivas para P-cadherina y células HT-29 negativas para P-cadherina para evaluar las posibles propiedades antagonistas del anticuerpo. La lectura de este ensayo es la forma y la rigidez del esferoide, según lo determinado mediante microscopía de campo claro y detección de fluorescencia del ADN celular con 7-AAD.

Se sembraron células HCT116 (positivas para P-cadherina) o células HT29 (negativas para P-cadherina) a una densidad de 6000 células por pocillo en placas de fijación ultrabaja de fondo redondo de 96 pocillos (Corning n.º de cat. 7007), con o sin Ab de control de isotipo IgG1 humano (10 µg/ml) o NOV169N31Q (10 µg/ml). Las células se colocaron en un agitador orbital (60 rpm) a 37 °C, CO₂ al 5 %. Se añadió 7-aminoactinomicina D (7-AAD; BD Pharmingen, n.º de cat. 559925) 116 horas después de que las células se sembraran en placas para marcar el ADN celular. Se capturaron imágenes de 7-AAD en un analizador de células GE IN 2000 utilizando el filtro Texas Red 132 horas después de sembrar las células. Se tomaron de 7 a 9 pilas de imágenes "z" de cada pocillo y las pilas de imágenes se colapsaron usando el programa IN Cell Developer Toolbox 1.8.

En la figura 7, NOV169N31Q mostró un efecto pequeño, pero discernible, sobre la adhesión celular mediada por P-cadherina en células HCT116 que expresan P-cadherina, pero no en células HT29 negativas para P-cadherina, como lo demuestra la microscopía de campo brillante y el análisis de densidad de esferoides determinado por las imágenes de 7-AAD (basadas en ADN). Por el contrario, un anticuerpo IgG1 humano de control inespecífico no influyó en la integridad de los esferoides multicelulares. Por lo tanto, NOV169N31Q puede ser un antagonista parcial de la función de la P-cadherina *in vitro* y/o *in vivo*.

Ejemplo 8: Inhibición por NOV169N31Q-MCC-DM1 de la proliferación y supervivencia celular

La capacidad del NOV169N31Q-MCC-DM1 para inhibir la proliferación y supervivencia celular se evaluó mediante el ensayo de proliferación CellTiterGlo®.

Las estirpes celulares se cultivaron en medios óptimos para su crecimiento en CO₂ al 5 %, a 37 °C en una incubadora de cultivo tisular. Antes de sembrar para el ensayo de proliferación, las células se dividieron al menos 2 días antes del ensayo para garantizar una densidad de crecimiento óptima. El día de la siembra, las células se extrajeron de los matraces de cultivo tisular utilizando tripsina al 0,25 %. Se determinaron la viabilidad celular y la densidad celular utilizando un contador celular (Vi-Cell XR Cell Viability Analyser, Beckman Coulter). Se sembraron células con una viabilidad superior al 85 % en placas de 96 pocillos con fondo transparente y paredes negras (Corning n.º de cat 3904) a una densidad de 2500 células por pocillo en 50 µl de medio de cultivo convencional. Los pocillos que al borde de las placas se llenaron de PBS para minimizar los efectos de la evaporación en los volúmenes de los pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C en un incubador de cultivo tisular. Al día siguiente, se prepararon maitansina libre (L-DM1-Me), NOV169N31Q-MCC-DM1 y el control de CAF no dirigido (IgG1-SMCC-DM1) a 2X en medio de cultivo convencional. A continuación, se añadieron los tratamientos farmacológicos preparados a las células, lo que dio lugar a concentraciones finales que oscilaban entre 0 y 100 nM y un volumen final de 100 µl por pocillo. Cada concentración de fármaco se evaluó por triplicado. Las placas se incubaron a 37 °C durante una noche o durante 5 días en una incubadora de cultivo tisular, después de lo cual se evaluó la viabilidad celular mediante la adición de 100 µl de CellTiter Glo® (Promega, n.º de cat G7573), un reactivo que lisa las células y mide el contenido total de trifosfato de adenosina (ATP). Las placas se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente en un agitador orbital a una velocidad que proporciona una mezcla adecuada durante 3 minutos para inducir la lisis celular. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar las señales luminiscentes antes de la lectura utilizando un contador de luminiscencia (Wallac 1450 MicroBeta TriLux, Perkin Elmer). Se tomaron recuentos luminiscentes de células sin tratar el día después de la siembra (lecturas del día 0) y después de 5 días de exposición al fármaco (lecturas del día 5). Como especificación del ensayo, las lecturas del día 5 de las células sin tratar se compararon con las lecturas del día 0. Se consideraron válidos los ensayos con al menos una duplicación celular durante el periodo de incubación. Para evaluar el efecto de los tratamientos farmacológicos, se utilizaron recuentos luminiscentes de pocillos que contenían células sin tratar (100 % de viabilidad) para normalizar las muestras tratadas. Los valores de CI₅₀ se calcularon utilizando el programa informático Graph Pad Prism 6. Cada estirpe celular se evaluó al menos 3 veces y se muestran valores de CI₅₀ representativos.

El NOV169N31Q-MCC-DM1 tiene una diana promedio de 3,8 moléculas de DM1 unidas a cada anticuerpo (relación fármaco/anticuerpo, o RFA, de 3,8). Se muestran las curvas de dosis y efecto de 3 estirpes celulares representativas

(figura 8). Se calcularon las concentraciones de tratamiento necesarias para inhibir el 50 % del crecimiento o la supervivencia celular (CI_{50}), y los valores representativos de CI_{50} de las estirpes celulares analizadas se resumen en la tabla 13.

Se demostró que el anticuerpo no conjugado NOV169N31Q no es citotóxico ni proliferativo, mientras que NOV169N31Q-MCC-DM1 inhibió de manera potente la proliferación y la supervivencia en estirpes celulares que expresan P-cadherina. Ninguna de las dos moléculas estaba activa en la estirpe celular HT29 negativa para P-cadherina (figura 8). Por el contrario, el NOV169N31Q-MCC-DM1 inhibió de manera potente el crecimiento de dos estirpes celulares de cáncer de mama, HCC1954 y HCC70. La tabla 13 resume la actividad de NOV169N31Q-MCC-DM1 en un panel de estirpes celulares. En comparación con el CAF de control no dirigido de isotipo coincidente (IgG1-MCC-DM1), el NOV169N31Q-MCC-DM1 mostró con frecuencia actividades citotóxicas hacia estirpes celulares que expresan más de >50.000 copias de P-cadherina en la superficie celular por célula. Estos estudios indican que el efecto citotóxico de NOV169N31Q-MCC-DM1 se debe al componente de maitansina internalizado del CAF y que NOV169N31Q-MCC-DM1 se dirige específicamente a las células que sobreexpresan P-cadherina.

Tabla 13: Expresión de P-cadherina y actividad NOV169N31Q-MCC-DM1 en un panel de estirpes celulares de cáncer humano. Valores de CI_{50} (nM) de NOV169N31Q-MCC-DM1 en comparación con maitansina libre (L-DM1-Me) y CAF de control de isotipo (IgG1-MCC-DM1) en el panel de estirpes celulares. Se notifican los valores máximos de destrucción celular para NOV169N31Q-MCC-DM1. Los valores notificados aquí son valores de ensayos individuales que son representativos de múltiples repeticiones.

Estirpe celular	Origen	Densidad de antígenos (x 1000)	CI_{50} (nM)			Destrucción celular máxima (%)
			NOV169N31Q-MCC-DM1	L-DM1-Me	IgG1-MCC-DM1	
scaBER	Vejiga	63	4,06	0,07	27,77	89
HCC1954	Mama	80	2,28	0,17	26,68	88
HCC38	Mama	95	5,29	0,09	35,10	81
HCC70	Mama	86	3,23	0,23	92,58	69
HCC1806	Mama	68	11,45	0,07	10,54	84
BICR6	Cabeza y cuello	70	9,62	0,16	25,34	71
A431	Piel	81	21,76	0,06	27,28	83
HT29	Colon	0,2	62,94	0,06	64,32	89

Ejemplo 9: Evaluación *in vitro* de la actividad ADCC inducida por NOV169N31Q y NOV169N31Q-MCC-DM1

Además de su repercusión en la proliferación, también se evaluó la capacidad de NOV169N31Q y NOV169N31Q-MCC-DM1 para mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

Las células efectoras eran células citolíticas naturales (NK) humanas intactas obtenidas de AllCells, LLC (n.º de catálogo PB012: células NK PB CD56+ normales nuevas/intactas). Las células diana se obtuvieron de la Colección americana de cultivos tipo (HCC1954 positiva para P-cadherina, HT-29 negativa para P-cadherina) a través de Novartis Cell Services (NCS). Se extrajeron células diana HCC1954 y HT-29 de recipientes de cultivo tisular usando un tampón de disociación celular sin tripsina ("tampón de disociación celular" de Gibco, n.º de cat. 13151-014), se lavaron 2-3 veces con PBS y se resuspendieron en medio de cultivo. Las células se contaron manualmente o utilizando un citómetro automático. Las células con >90 % de viabilidad se suspendieron a 1×10^5 células/ml en medio de cultivo. Las células NK humanas se lavaron y contaron de la misma manera que las estirpes celulares diana. A continuación, se suspendieron las células efectoras a $1-2 \times 10^6$ células/ml en medio de cultivo celular.

Los tratamientos incluyen el anticuerpo NOV169N31Q, el anticuerpo de control de isotipo coincidente (control de IgG1), así como los conjugados de anticuerpos y fármacos NOV169N31Q-MCC-DM1 e IgG1-SMCC-DM1. Se sembraron 5000 células diana en 50 μ l de medio en placas de fondo plano de 96 pocillos (Corning n.º 3603). A continuación, se añadieron los anticuerpos de ensayo y de control a una concentración final 4X (intervalo de concentración final de 50 a 0,0001 μ g/ml, además de controles sin tratamiento) en 25 μ l de medio durante 20 minutos a 37 °C. A continuación, se añadieron células efectoras en una relación de células efectoras con respecto a diana (E:T) de 5:1 en 25 μ l de medio (p. ej., 25.000 células efectoras por pocillo para una relación de 5:1). Los tratamientos y controles (solo células diana, solo células efectoras, sin células) se ejecutaron por triplicado. A continuación, las placas se centrifugaron a 500 RPM (sin freno) en una centrífuga para concentrar las células en el fondo de la placa. A continuación, las placas se incubaron en condiciones normales de cultivo celular (37 °C, CO₂ al 5 %) durante 24 h.

Después del periodo de incubación, se retiró el medio de las placas y los pocillos se lavaron con PBS 2-3 veces para eliminar las células efectoras no adherentes. Se añadieron 100 µl de Cell Titer Glo (Promega n.º de cat G7570) a cada pocillo, las placas se protegieron de la luz y se colocaron en un agitador orbital durante 2 minutos. A continuación, se leyeron las placas en un contador de luminiscencia (Wallac Trilux MicroBeta 1450). La señal detectada por el contador de luminiscencia es directamente proporcional a la cantidad de ATP o el número de células que quedan en los pocillos. Utilizando los pocillos de control como punto de referencia, se puede determinar el número de células viables para cada tratamiento como porcentaje del control sin tratar.

El NOV169N31Q-MCC-DM1 y el NOV169N31Q demostraron una capacidad para mediar en la actividad ADCC contra células que sobreexpresan P-cadherina en presencia de células citolíticas naturales (NK) humanas *in vitro* de manera dependiente de la dosis (figura 9). Se descubrió que esta actividad era específica de P-cadherina, ya que un control de isotipo coincidente tanto para el anticuerpo como para el CAF no demostró una destrucción celular significativa. Ni el NOV169N31Q ni el NOV169N31Q-MCC-DM1 muestran ninguna inducción de ADCC en la estirpe celular HT-29 negativa para P-cadherina, lo que también indica un efecto específico del anticuerpo y el conjugado de anticuerpo y fármaco. Por lo tanto, además de la administración de carga citotóxica a las células tumorales, la ADCC representa otro mecanismo potencial de acción de NOV169N31Q-MCC-DM1 para destruir células tumorales *in vivo*.

Ejemplo 10: Modulación de marcadores farmacodinámicos *in vivo* en la diana mediante CAF anti-P-cadherina

Se realizó un estudio para evaluar la capacidad del CAF de P-cadherina NOV169N31Q-MCC-DM1 para modular un marcador farmacodinámico de detención en G2/M [acumulación de células con fosfohistona H3 (pHH3)] *in vivo*. El objetivo era evaluar el grado y la duración de la detención del ciclo celular G2/M en tumores de ratones tratados con NOV169N31Q-MCC-DM1, un CAF de control de isotipo o vehículo solo.

Para medir la acumulación de núcleos positivos para pHH3, según lo evaluado por inmunohistoquímica, se obtuvo un anticuerpo policlonal de conejo producido al inmunizar animales con un fosfopéptido sintético correspondiente a los restos que rodean Ser10 fosforilado de la histona H3 humana (pHH3) de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, n.º de cat 9701). En resumen, el protocolo de IHC incluyó calor y exposición convencional al reactivo de recuperación de antígeno Ventana Cell Conditioning n.º 1. El anticuerpo primario se diluyó a 1:50 y se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una incubación con anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-conejo de Jackson ImmunoResearch Laboratories (n.º de cat 111-065-144, West Grove, PA) durante 32 minutos.

Para evaluar los cambios en los marcadores PD inducidos por CAF anti-P-cadherina en el modelo de cáncer de mama triple negativo HCC70 en un modelo de xenoinjerto de tumor subcutáneo, se implantaron en ratonas SCID-beige por vía subcutánea 10×10^6 células en una suspensión que contenía 50 % de Matrigel™ (BD Biosciences) en solución salina equilibrada de Hank.

El volumen total de inyección que contenía células en suspensión fue de 200 µl. Los ratones se asignaron aleatoriamente para recibir una única dosis intravenosa (IV) de NOV169N31Q-MCC-DM1 (10 mg/kg), control de isotipo IgG1-MCC-DM1 inespecífico (10 mg/kg) o control de vehículo vacío (histidina 20 mM, sacarosa 8,22 %, PS-20 0,02 %, pH 5,6) una vez que los tumores promediaron $\sim 130 \text{ mm}^3$ (n=3/grupo). Los tumores se recogieron en puntos temporales hasta 21 días después de la dosis. Como medida de la respuesta PD, se realizó una evaluación cualitativa de los niveles de fosfohistona H3 (pHH3) mediante tinción inmunohistoquímica descrita anteriormente.

En la figura 10, de acuerdo con el mecanismo de acción esperado de la carga útil de maitansinoide, aunque se detectó alguna tinción de inmunotinción con fosfohistona H3 basal en los tumores tratados con vehículo, estos niveles se elevaron después del tratamiento con NOV169N31Q-MCC-DM1, particularmente entre los días 2-7 después de la dosis. Estos datos demuestran que el NOV169N31Q-MCC-DM1 es capaz de inducir una respuesta PD celular sólida en xenoinjertos tumorales, coherente con el mecanismo de acción de la carga útil de maitansinoide.

Ejemplo 11: Eficacia *in vivo* de los CAF anti-P-cadherina contra el modelo de cáncer de mama triple negativo (TNBC) HCC70 en ratones (detección de la eficacia del CAF)

En los cánceres de mama, la P-cadherina tiene con frecuencia una alta expresión, como lo ilustra la estirpe celular HCC70 con aproximadamente 66.000 receptores en la superficie de cada célula. Se muestra una fotografía representativa de la inmunotinción con P-cadherina en tumores HCC70 para visualizar el patrón de tinción en este modelo de xenoinjerto (figura 11A). La IHC se realizó utilizando un aparato de tinción automático Ventana Discovery XT. Se desparafinaron secciones de tumores fijados con formalina e incluidos en parafina, se trataron con el reactivo de recuperación de antígeno Ventana Cell Conditioning n.º 1 (CCIS) y después se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente en el anticuerpo primario [anticuerpo monoclonal de ratón anti-P-cad humana de BD Transduction Lab (n.º de cat 610228, lote 09934)] en una concentración de 10 µg/ml. A esto le siguió la incubación con un antirratón de cabra biotinilado (Jackson Laboratories, n.º de cat 115-066-072, n.º de lote 63620) utilizado en una concentración de trabajo de 1:250. La detección se realizó utilizando el kit DAB Map (Ventana Medical, n.º de cat 760-124). Se usó un anticuerpo IgG de ratón inespecífico

(Vector Laboratories n.º de cat I-2000, n.º de lote V0610) como control para garantizar que la tinción observada con el anticuerpo contra P-cadherina fuera específica.

Cuando los tumores alcanzaron ~215 mm³, los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor a grupos de tratamiento (n = 8/grupo) y se les administró una única dosis i.v. de vehículo o 7 mg/kg de CAF. Se seleccionó el nivel de dosis de 7 mg/kg porque se esperaba que proporcionara una ventana para discernir diferencias entre los candidatos a CAF en este modelo. Las dosis se ajustaron al peso corporal de los ratones individuales. El volumen de la dosis i.v. fue de 8 ml/kg.

Los volúmenes tumorales medios en los grupos tratados con NEG0012-MCC-DM1 y NOV169N31Q-MCC-DM1 fueron significativamente diferentes del grupo de control hulgG1-MCC-DM1 con isotipo coincidente el día 42 (ANOVA unidireccional; método de Dunn, $p \leq 0,05$). Los otros grupos tratados con candidatos a CAF no mostraron volúmenes tumorales estadísticamente diferentes en comparación con los controles (figura 11B). Esto destacó a NEG0012-MCC-DM1 y NOV169N31Q-MCC-DM1 como candidatos principales a CAF. No se observó una pérdida significativa de peso corporal en ningún grupo.

Ejemplo 12: Eficacia *in vivo* dependiente de la dosis de NOV169N31Q-MCC-DM1 contra el modelo de cáncer de mama triple negativo (TNBC) HCC70 en ratones

Se demostró que la estirpe celular HCC70 con aproximadamente 66.000 receptores en la superficie de cada célula es sensible a NOV169N31Q-MCC-DM1 *in vitro*. Para demostrar la actividad antitumoral dirigida por NOV169N31Q-MCC-DM1 en el modelo HCC70, se administró un único tratamiento i.v. de 2,5, 5, 10 y 15 mg/kg o 10 mg/kg de NOV169N31Q-MCC-DM1 o control de isotipo inespecífico IgG1-MCC-DM1. Los tumores HCC70 se establecieron en ratonas SCID mediante inyección subcutánea de 10×10^6 células en el flanco derecho de cada ratón. Cuando los tumores alcanzaron ~143 mm³, los ratones se distribuyeron aleatoriamente según el volumen tumoral en grupos de tratamiento (n = 9). Todos los agentes de prueba se administraron a los niveles de dosis y programas indicados y las dosis se ajustaron al peso corporal de los ratones individuales. El volumen de la dosis i.v. fue de 5 ml/kg.

El tratamiento con NOV169N31Q-MCC-DM1 dio lugar a una eficacia antitumoral proporcional a la dosis, con valores de $\Delta T/\Delta C$ del 48 % (2,5 mg/kg), 1 % (5 mg/kg), mientras que las dosis de 10 y 15 mg/kg dieron lugar a una regresión media del 64 % y el 61 %, respectivamente. La eficacia máxima se alcanzó con 10 mg/kg. Los grupos de 5, 10 y 15 mg/kg resultaron estadísticamente diferentes del tratamiento con vehículo ($P < 0,05$, ANOVA por rangos/método de Dunn, día 59). Los niveles de dosis de 10 y 15 mg/kg provocaron regresiones tumorales duraderas en ratones que duraron hasta 86 días después del tratamiento, cuando finalizó el estudio.

Todos los agentes de prueba fueron tolerados en el estudio y no se observaron síntomas clínicos evidentes de toxicidad en ninguno de los grupos de tratamiento, como se esperaba para un CAF que no se une a la P-cadherina de ratón. En todos los grupos, se observó un aumento de peso corporal en comparación con los pesos corporales medios en el momento de la aleatorización y fue similar al de los ratones tratados con vehículo, como se esperaba para un CAF que no se une a P-cadherina de ratón (figura 12 y tabla 14).

Tabla 14: Eficacia de respuesta a la dosis de NOV169N31Q-MCC-DM1 en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama HCC70 el día 59. El efecto del tratamiento sobre los volúmenes tumorales y los pesos corporales se presenta como medias \pm EEM. El experimento se evaluó el día de tratamiento 59. * $p < 0,001$ frente a vehículo (ANOVA por rangos unidireccional de Kruskal-Wallis/método de Dunn). $\% \Delta T/\Delta C = 100 \Delta T/\Delta C$ donde: ΔT = volumen tumoral medio del grupo tratado con el fármaco el día 21 del estudio - volumen tumoral medio del grupo tratado con el fármaco el día inicial de la dosificación; ΔC = volumen tumoral medio del grupo de control el día 21 del estudio - volumen tumoral medio del grupo de control el día inicial de la dosificación. $\%$ de regresión = $1 - T_{\text{final}}/T_{\text{inicial}} \times 100$

Compuesto	Dosis, cronograma	Respuesta tumoral		Respuesta del anfitrión	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	Regresión (%)	Δ peso corporal (%)	Supervivencia (vivos/totales)
Vehículo	Ninguna, dosis única	100	-	11,1 \pm 1,6	9/9
IgG1-MCC-DM1	10 mg/kg, dosis única	119	-	10,9 \pm 1,7	9/9
NOV169N31Q-MCC-DM1	2,5 mg/kg, dosis única	48	-	10,2 \pm 2,5	9/9
NOV169N31Q-MCC-DM1	5 mg/kg, dosis única	1*	-	12,0 \pm 2,4	8/9
NOV169N31Q-MCC-DM1	10 mg/kg, dosis única	-	-64*	9,9 \pm 2,3	9/9
NOV169N31Q-MCC-DM1	15 mg/kg, dosis única	-	-61 *	8,8 \pm 1,9	9/9

Ejemplo 13: Eficacia *in vivo* de NOV169N31Q-MCC-DM1 contra el modelo de cáncer de mama HCC1954 en ratones

Para demostrar la eficacia en un modelo adicional de cáncer de mama, se evaluó la actividad de NOV169N31Q-MCC-DM1 en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama de tipo basal (Her2+) HCC1954 en ratones SCID-beige. El modelo HCC1954 se seleccionó en función de la expresión de P-cadherina (84.000 receptores/célula) y la sensibilidad a NOV169N31Q-MCC-DM1 *in vitro*. Se realizó inmunohistoquímica para confirmar los niveles de proteína P-cadherina tumoral en tumores HCC70 como se ha descrito anteriormente (figura 13A).

Cuando los tumores alcanzaron ~150 mm³, los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor a grupos de tratamiento (n = 9/grupo) y se les administró una única dosis i.v. de vehículo o 10 mg/kg de IgG1-MCC-DM1 o NOV169N31Q-MCC-DM1. Las dosis se ajustaron al peso corporal de los ratones individuales. El volumen de la dosis i.v. fue de 5 ml/kg.

El tratamiento con NOV169N31Q-MCC-DM1 dio lugar a una regresión del 56 % de los tumores HCC1954, que fue duradera hasta el día 55 (frente al vehículo o IgG1-MCC-DM1, $p < 0,05$, ANOVA por rangos unidireccional de Kruskal-Wallis/método de Dunn). La eficacia de IgG1-MCC-DM1 fue un % $\Delta T/\Delta C$ del 75 % y no fue significativamente diferente del vehículo ($p > 0,05$). Todos los agentes de prueba fueron tolerados en el estudio y no se observaron síntomas clínicos evidentes de toxicidad en ninguno de los grupos de tratamiento (figura 13B y tabla 15A).

Tabla 15A: Eficacia de NOV169N31Q-MCC-DM1 en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama HCC1954 el día 31. El efecto del tratamiento sobre los volúmenes tumorales y los pesos corporales se presenta como medias \pm EEM. El experimento se evaluó el día de tratamiento 31. * $p < 0,001$ frente a vehículo (ANOVA por rangos unidireccional de Kruskal-Wallis/método de Dunn).

Agente de prueba	Dosis, cronograma	Respuesta tumoral			Respuesta del anfitrión	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	Regresión (%)	Δ Volumen tumoral (mm ³)	Δ peso corporal (%)	Supervivencia (vivos/totales)
Vehículo	Ninguna, dosis única	100	-	289 \pm 49	4,1 \pm 1,6	9/9
IgG1-MCC-DM1	10 mg/kg, dosis única	75	-	218 \pm 36	4,3 \pm 1,5	9/9
NOV169N31Q-MCC-DM1	10 mg/kg, dosis única	-	-55,8*	-82 \pm 10	4,8 \pm 1,7	9/9

En otro ejemplo, se evaluó la actividad de NOV169N31Q-MCC-DM1 en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama de tipo basal (Her2+) HCC1954 en ratones SCID. El modelo HCC1954 se seleccionó en función de la expresión de P-cadherina (84.000 receptores/célula) y la sensibilidad a NOV169N31Q-MCC-DM1 *in vitro*. Cuando los tumores alcanzaron ~190 mm³, los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor a grupos de tratamiento (n = 5/grupo) y se les administraron dos dosis (proporcionadas el día 0 y el día 7) i.v. de vehículo, 15 mg/kg de NOV169N31Q o 15 mg/kg de NOV169N31Q-MCC-DM1. Las dosis se ajustaron al peso corporal de los ratones individuales. El volumen de la dosis i.v. fue de 10 ml/kg. El tratamiento con NOV169N31Q-MCC-DM1 dio lugar a una regresión del 100 % de los tumores HCC1954, que fue duradera hasta el final del estudio el día 56 (frente al vehículo, $p < 0,05$, ANOVA por rangos unidireccional de Kruskal-Wallis/método de Dunn, figura 13C). La eficacia de NOV169N31Q fue un % $\Delta T/\Delta C$ del 121,4 % y no fue significativamente diferente del vehículo ($p > 0,05$). Todos los agentes de prueba fueron tolerados en el estudio y no se observaron síntomas clínicos evidentes de toxicidad en ninguno de los grupos de tratamiento (figura 13D y tabla 15B).

TABLA 15B: Eficacia de NOV169N31Q-MCC-DM1 en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama HCC1954 el día 56. El efecto del tratamiento sobre los volúmenes tumorales y los pesos corporales se presenta como medias \pm EEM. El experimento se evaluó el día de tratamiento 56. * $p < 0,05$ frente a vehículo (ANOVA por rangos unidireccional de Kruskal-Wallis/método de Dunn).

Agente de prueba	Dosis, cronograma	Respuesta tumoral			Respuesta del anfitrión	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	Regresión (%)	Δ Volumen tumoral (mm ³)	Δ peso corporal (%)	Supervivencia (vivos/totales)
Vehículo	Ninguna, días 0 y 7	100	-	925 \pm 147	8,4 \pm 1,0	5/5
NOV169N31Q	15 mg/kg, días 0 y 7	121,4	-	1123 \pm 134	9,9 \pm 1,7	5/5

Agente de prueba	Dosis, cronograma	Respuesta tumoral			Respuesta del anfitrión	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	Regresión (%)	Δ Volumen tumoral (mm ³)	Δ peso corporal (%)	Supervivencia (vivos/totales)
NOV169N31Q-MCC-DM1	15 mg/kg, días 0 y 7	-20,8	-100*	-192 \pm 9	9,0 \pm 0,7	5/5

Ejemplo 14: Eficacia *in vivo* de NOV169N31Q-MCC-DM1 contra el modelo de cáncer de cabeza y cuello BICR6 (carcinoma de células escamosas de hipofaringe) en ratones

Se realizó una evaluación de la eficacia del NOV169N31Q-MCC-DM1 en la estirpe celular BICR6 basándose en su expresión de P-cadherina de 70.000 receptores/célula y sensibilidad a NOV169N31Q-MCC-DM1 *in vitro*. Se realizó inmunohistoquímica para confirmar los niveles de P-cadherina tumoral en tumores BICR6 como se ha descrito anteriormente, donde el 82 % de las células tumorales tiñen al menos 2+ para P-cadherina (figura 14A).

Los tumores BICR6 se establecieron en ratonas SCID-beige mediante injerto subcutáneo de 5×10^6 células tumorales en el flanco derecho de cada ratón. Cuando los tumores alcanzaron ~ 130 mm³, los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor a grupos de tratamiento (n = 10/grupo) y se les administró una dosis i.v. de vehículo o 10 mg/kg de IgG1-MCC-DM1 o NOV169N31Q-MCC-DM1 proporcionados cada 7 días (c7dx2). Las dosis se ajustaron al peso corporal de los ratones individuales. El volumen de la dosis i.v. fue de 5 ml/kg.

El tratamiento con NOV169N31Q-MCC-DM1 dio lugar a una regresión tumoral máxima del 37 % (el día 26 del estudio). En general, la respuesta tumoral de estasis fue duradera con NOV169N31Q-MCC-DM1 ($\Delta T/\Delta C$ 1 %, p < 0,05, ANOVA por rangos unidireccional de Kruskal-Wallis/prueba de Tukey) hasta 42 días después de la dosificación. Todos los agentes de prueba fueron tolerados en el estudio y no se observaron síntomas clínicos evidentes de toxicidad en ninguno de los grupos de tratamiento (figura 14B y tabla 16).

Tabla 16: Eficacia de NOV169N31Q-MCC-DM1 en el modelo de xenoinjerto de carcinoma de células escamosas humano BICR6 de la hipofaringe (cabeza y cuello) el día 42. El efecto del tratamiento sobre los volúmenes tumorales y los pesos corporales se presenta como medias \pm EEM. El experimento se evaluó el día de tratamiento 42. *p<0,05 frente a vehículo (ANOVA por rangos unidireccional de Kruskal-Wallis/prueba de Tukey).

Agente de prueba	Dosis, cronograma	Respuesta tumoral			Respuesta del anfitrión	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	Regresión (%)	Δ Volumen tumoral (mm ³)	Δ peso corporal (%)	Supervivencia (vivos/totales)
Vehículo	Ninguna, c2s x 2	100	-	386 \pm 90	7,6 \pm 1,4	10/10
IgG1-MCC-DM1	10 mg/kg, c2s x 2	136	-	526 \pm 96	8,9 \pm 1,1	10/10
NOV169N31Q-MCC-DM1	10 mg/kg, c2s x 2	1*	-	5 \pm 20	7,4 \pm 2,3	10/10

Ejemplo 15: Eficacia *in vivo* de NOV169N31Q-MCC-DM1 contra el modelo de cáncer de vejiga scaBER en ratones

La actividad antitumoral de NOV169N31Q-MCC-DM1 se evaluó en un modelo de xenoinjerto de cáncer de vejiga urinaria scaBER, seleccionado en función de su expresión de P-cadherina de 63.000 receptores/célula y sensibilidad a NOV169N31Q-MCC-DM1 *in vitro*. Se realizó inmunohistoquímica para confirmar los niveles de P-cadherina tumoral en tumores scaBER, que muestran aproximadamente el 52 % de las células tumorales teñidas al menos 2+. (Figura 15A).

Los tumores scaBER se establecieron en ratonas SCID-beige mediante injerto subcutáneo de fragmentos tumorales en el flanco derecho de cada ratón. Cuando los tumores alcanzaron ~ 130 mm³, los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor a grupos de tratamiento (n = 10/grupo) y se les administró una dosis i.v. de vehículo o 10 mg/kg de IgG1-MCC-DM1 o NOV169N31Q-MCC-DM1 proporcionados dos veces, con dos semanas de diferencia (c2s x 2). Las dosis se ajustaron al peso corporal de los ratones individuales. El volumen de la dosis i.v. fue de 5 ml/kg.

El tratamiento con NOV169N31Q-MCC-DM1 dio lugar a un $\Delta T/\Delta C$ del 18 % (frente a vehículo o IgG1-MCC-DM1, p<0,05, ANOVA/prueba de Tukey, día 35). La eficacia de IgG1-MCC-DM1 fue un $\Delta T/\Delta C$ del 86 % y no fue significativamente diferente del vehículo (p>0,05). Todos los agentes de prueba fueron tolerados en el estudio y no se observaron síntomas clínicos evidentes de toxicidad en ninguno de los grupos de tratamiento (figura 15B y tabla 17).

Tabla 17: Eficacia de NOV169N31Q-MCC-DM1 en el modelo de xenoinjerto de carcinoma escamoso de vejiga urinaria humana scaBER el día 42. El efecto del tratamiento sobre los volúmenes tumorales y los pesos corporales se presenta

como medias \pm EEM. El experimento se evaluó el día de tratamiento 42. * $p < 0,001$ frente a vehículo (ANOVA por rangos unidireccional de Kruskal-Wallis/prueba de Tukey).

Agente de prueba	Dosis, cronograma	Respuesta tumoral			Respuesta del anfitrión	
		$\Delta T/\Delta C$ (%)	Regresión (%)	Δ Volumen tumoral (mm ³)	Δ peso corporal (%)	Supervivencia (vivos/totales)
Vehículo	Ninguna, c2s \times 2	100	-	279 \pm 67	5,6 \pm 1,9	10/10
IgG1-MCC-DM1	10 mg/kg, c2s \times 2	86	-	239 \pm 56	4,9 \pm 1,8	10/10
NOV169N3 1Q-MCC-DM1	10 mg/kg, c2s \times 2	18*	-	50 \pm 15	2,1 \pm 1,5	10/10

5 **Ejemplo 16: Eficacia *in vivo* de NOV169N31Q-MCC-DM1 contra el modelo de cáncer de esófago ES2267 HuPrime® en ratones**

10 La actividad antitumoral de NOV169N31Q-MCC-DM1 se evaluó en el modelo de xenoinjerto de cáncer de esófago ES2267 que expresa P-cadherina. Se implantaron fragmentos de tumor por vía subcutánea en el flanco derecho de cada ratona BALB/c desnuda. Cuando los tumores alcanzaron ~ 154 mm³, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en consecuencia en los grupos de tratamiento (n = 5). NOV169N31Q-MCC-DM1 o el control de isotipo no específico humanizado 3207-MCC-DM1 dosificado a 10 mg/kg se administraron por vía i.v. los días 0 y 13 después de la aleatorización. Las dosis se ajustaron al peso corporal de los ratones individuales. El volumen de la dosis i.v. fue de 10 ml/kg.

15 El tratamiento con NOV169N31Q-MCC-DM1 a 10 mg/kg dio lugar a eficacia antitumoral en comparación con el vehículo con una media de regresión del 58 % el día 21. Además, no se observó eficacia antitumoral significativa después del tratamiento con el control de isotipo inespecífico IgG1-MCC-DM1 a 10 mg/kg. El día 21 y el último día del estudio (día 53), el NOV169N31Q-MCC-DM1 resultó estadísticamente diferente de los grupos tratados con vehículo y control de isotipo IgG1-MCC-DM1 ($P < 0,05$, ANOVA/método de Holm-Sidak, día 21). Todos los agentes de prueba fueron bien tolerados y no se observó pérdida de peso en ninguno de los grupos de tratamiento, como se esperaba para un CAF que no se une a la P-cadherina de ratón (figura 16 y tabla 18).

25 Tabla 18: Eficacia de NOV169N31Q-MCC-DM1 en el modelo de xenoinjerto de cáncer de esófago ES2267 HuPrime® el día 21 (regresión tumoral máxima después de la dosis). El efecto del tratamiento sobre los volúmenes tumorales y los pesos corporales se presenta como medias \pm EEM. El experimento se evaluó el día 21 del tratamiento, cuando los tumores con NOV169N31Q-MCC-DM1 alcanzaron su máxima regresión después del tratamiento. * $p = 0,014$ frente al vehículo (ANOVA de rangos unidireccional/método de Holm-Sidak).

Compuesto	Dosis, vía, horario	Respuesta tumoral			Respuesta del anfitrión
		Tamaño tumoral (mm ³ +/- EEM)	$\Delta T/\Delta C$ (%)	Regresión (%)	Supervivencia (vivos/totales)
Vehículo	0 mg/kg, i.v., días 0 y 13	361 \pm 48	100	--	5/5
NOV169N31Q-MCC-DM1	10 mg/kg, i.v., días 0 y 13	66 \pm 24	43	58*	5/5
IgG1-MCC-DM1	10 mg/kg, i.v., días 0 y 13	267 \pm 54	55	-	5/5

30 **Ejemplo 17: Comparación de la eficacia de NEG0067 conjugado con DM1 usando dos conectores (MCC y CX1-1) en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama HCC70**

35 Se utilizó el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama HCC70 para comparar la eficacia antitumoral de un anticuerpo anti-P-cadherina NEG0067 conjugado con DM1 utilizando los conectores MCC frente a CX-1-1. Cuando los tumores alcanzaron ~ 215 mm³, los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor a grupos de tratamiento (n = 8/grupo) y se les administró una única dosis i.v. de vehículo o 7 mg/kg de CAF. Las dosis se ajustaron al peso corporal de los ratones individuales. El volumen de la dosis i.v. fue de 8 ml/kg.

40 El volumen medio del tumor en el grupo NEG0067-CX1-1-DM1 fue significativamente diferente al del grupo de control IgG1-CX1-1-DM1 (ANOVA unidireccional; método de Dunn, $p \leq 0,05$), mientras que NEG0067-MCC-DM1 no fue estadísticamente diferente de IgG1-MCC-DM1. Sin embargo, hubo una tendencia hacia una mayor actividad en el grupo tratado con IgG1-CX1-1-DM1 en comparación con el grupo tratado con hulgG1-MCC-DM1 (figura 17).

Ejemplo 18: Evaluación de la eficacia de los CAF anti-P-cadherina derivados de hibridoma murino conjugados usando la carga útil con conector SPDB-DM4 (conector escindible) en el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama HCC70

- 5 Se utilizó el modelo de xenoinjerto de cáncer de mama HCC70 para comparar la eficacia antitumoral de 3 CAF derivados de hibridoma murino utilizando la carga útil con conector SBDB-DM4. Cuando los tumores alcanzaron ~150 mm³, los ratones se asignaron al azar según el volumen del tumor a grupos de tratamiento (n = 10/grupo) y se les administró una única dosis i.v. de vehículo o 5 mg/kg de CAF. Las dosis se ajustaron al peso corporal de los ratones individuales.
- 10 Una dosis única de 5 mg/kg de los tres CAF unidos a SPDB-DM4 indujo significativamente regresiones tumorales duraderas ($p \leq 0,05$), con cierta recidiva del tumor en el grupo tratado con 2P10-SPDB-DM4. Los tumores permanecieron completamente en regresión en los grupos tratados con 1G12-SPDB-DM4 o 3D21-SPDB-DM4 (figura 18).

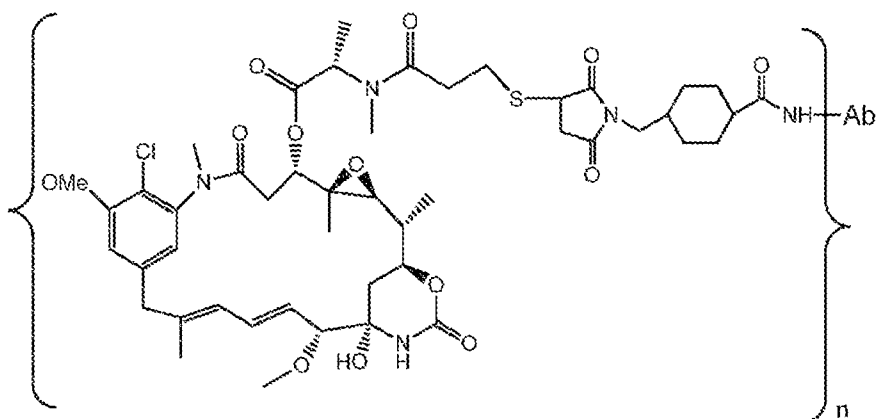
Ejemplo 19: Formulación de CAF

- 15 La formulación para investigación clínica (CSF) del CAF NOV169N31Q-MCC-DM1 es un liofilizado en vial que contiene 50 mg de NOV169N31Q-MCC-DM1. Después de la reconstitución del liofilizado con 5 ml de agua para inyección, se obtiene una solución que contiene 10 mg/ml de NOV169N31Q-MCC-DM1, L-histidina/clorhidrato de L-histidina monohidrato 20 mM, sacarosa 240 mM y polisorbato 20 al 0,02 % a un pH de 5,3.
- 20 Para la administración intravenosa posterior, la solución obtenida habitualmente se diluirá aún más en una solución portadora para obtener la solución de CAF para infusión lista para usar.
- 25 Para la CSF, se eligió una concentración de CAF de 10 mg/ml. Se seleccionó una concentración de sacarosa de 240 mM para crear una formulación isotónica, con el fin de mantener una estructura de torta de liofilizado amorfa y lograr la estabilización de proteínas.
- 30 Los métodos analíticos indicadores de estabilidad importantes para seleccionar la formulación más estable abarcaron, entre otros, la cromatografía de exclusión por tamaño para determinar los niveles de agregación, las pruebas de partículas subvisibles, la determinación de toxinas libres y las pruebas de potencia. El estudio de preselección mostró que el polisorbato 20 en una concentración del 0,02 % proporciona suficiente estabilización contra la tensión mecánica. Los estudios de estabilidad líquida y liofilizada en tiempo real y las condiciones de estabilidad aceleradas (25 °C y 40 °C) demostraron que una formulación a base de histidina a un valor de pH entre 5,0 y 5,5 proporciona la mejor estabilidad general en almacenamiento. Cabe destacar que en este intervalo se pudieron alcanzar los equilibrios de todas las formulaciones probadas entre agregación y liberación de la toxina libre. Un estudio de estabilidad de dos meses a 25 °C y 40 °C demostró niveles muy bajos de productos de agregación y degradación.
- 35

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a P-cadherina que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 VH de la SEQ ID NO: 1, una CDR2 VH de la SEQ ID NO: 2 y una CDR3 VH de la SEQ ID NO: 3, en donde la CDR se define de acuerdo con la definición de Kabat; y una región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 VL de la SEQ ID NO: 11, una CDR2 VL de la SEQ ID NO: 12 y una CDR3 VL de la SEQ ID NO: 13, en donde la CDR se define de acuerdo con la definición de Kabat.
2. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a P-cadherina que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 y una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.
3. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a P-cadherina que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19.
4. Un conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende la fórmula

$$Ab-(L-(D)_m)_n$$
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde
Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
L es un conector;
D es una porción farmacológica;
m es un número entero entre 1 y 8; y
n es un número entero entre 1 y 10.
5. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 4, en donde m es 1.
6. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 4, en donde n es 3 o 4.
7. El conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
8. El conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en donde dicho conector se selecciona del grupo que consiste en un conector escindible, un conector no escindible, un conector hidrófilo, un conector procargado y un conector basado en el ácido dicarboxílico.
9. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 8, en donde el conector procede de un reactivo de reticulación seleccionado del grupo que consiste en N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP), N-succinimidil-4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)-2-sulfo-butanoato (sulfo-SPDB), N-succinimidil yodoacetato (SIA), N-succinimidil (4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB), maleimida PEG NHS, N-succinimidil 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-sulfosuccinimidil 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (sulfo-SMCC) y 2,5-dioxopirrolidin-1-il 17-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetraazaheptadecan-1-oato (CX1-1).
10. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 9, en donde dicho conector deriva de reactivos de reticulación seleccionados del grupo que consiste en N-succinimidil 4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-succinimidil 4-(2-piridilditio)butanoato (SPDB) y 2,5-dioxopirrolidin-1-il 17-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-5,8,11,14-tetraoxo-4,7,10,13-tetraazaheptadecan-1-oato (CX1-1).
11. El conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 4-10, en donde dicha porción farmacológica se selecciona de un grupo que consiste en un inhibidor de la V-ATPasa, un agente proapoptótico, un inhibidor de Bcl2, un inhibidor de MCL1, un inhibidor de HSP90, un inhibidor de IAP, un inhibidor de mTor, un estabilizador de microtúbulos, un desestabilizador de microtúbulos, una auristatina, una dolastatina, un maitansinoide, una MetAP (metionina aminopeptidasa), un inhibidor de la exportación nuclear de proteínas CRM1, un inhibidor de DPPIV, inhibidores de proteasomas, inhibidores de reacciones de transferencia de fosforilo en las mitocondrias, un inhibidor de la síntesis de proteínas, un inhibidor de cinasas, un inhibidor de CDK2, un inhibidor de CDK9, un inhibidor de cinesina, un inhibidor de HDAC, un agente que daña el ADN, un agente alquilante de ADN, un intercalante de ADN, un agente de unión al surco menor del ADN y un inhibidor de DHFR.
12. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 11, en donde el agente citotóxico es un maitansinoide.
13. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 12, en donde el maitansinoide es N(2')-desacetil-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1) o N(2')-desacetil-N2-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)-maitansina (DM4).
14. El conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 4 que tiene la siguiente fórmula:



en donde el Ab es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende una CDR1 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 1, una CDR2 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 2, una CDR3 de cadena pesada de la SEQ ID NO: 3 y una CDR1 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 11, una CDR2 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 12, una CDR3 de cadena ligera de la SEQ ID NO: 13, en donde la CDR se define de acuerdo con la definición de Kabat; y n es de 1 a 10; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

16. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 4-14 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

17. La composición farmacéutica de la reivindicación 15 o 16, en donde dicha composición se prepara como un liofilizado.

18. La composición farmacéutica de la reivindicación 17, en donde dicho liofilizado comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o el conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 4-14, histidina, sacarosa y polisorbato 20.

19. La composición farmacéutica de la reivindicación 18, en donde la composición comprende aproximadamente 10 mg/ml del conjugado de anticuerpo y fármaco de la reivindicación 14, histidina 20 mM, sacarosa 240 mM y polisorbato 20 al 0,02 %.

20. El conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 4-14 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 15-19 para su uso como un medicamento.

21. El conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 4-14 o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 15-19 para su uso en el tratamiento del cáncer en un paciente que lo necesite.

22. El conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 4-14 para su uso según la reivindicación 21 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 15-19 para su uso según la reivindicación 21, en donde el cáncer expresa P-cadherina.

23. El conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 4-14 para su uso según la reivindicación 22 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 15-19 para su uso según la reivindicación 22, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma adrenocortical, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, cáncer de mama, teratomas/tumores rabdoides atípicos del sistema nervioso central, cáncer de colon, cáncer colorrectal, tumores embrionarios, cáncer de endometrio, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, sarcoma de Kaposi, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, incluido el cáncer microcítico de pulmón y el cáncer no microcítico de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de recto, rabdomiosarcoma, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer escamoso de cuello, cáncer de estómago, cáncer de útero, cáncer de vagina y cáncer de vulva.

24. El conjugado de anticuerpo y fármaco de una cualquiera de las reivindicaciones 4-14 para su uso según la reivindicación 23 o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 15-19 para su uso según la reivindicación 23, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de vejiga, de mama, de colon, colorrectal, de endometrio, de esófago, gástrico, de cabeza y cuello, de pulmón y de ovario.

25. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado, o un anticuerpo monoclonal, o donde dicho fragmento de unión a antígeno es un anticuerpo monocatenario (scFv).

26. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 25.
- 5 27. El ácido nucleico de la reivindicación 26, en donde el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 8, 18, 10 o 20.
28. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 26 o 27.
- 10 29. Una célula hospedadora que comprende el vector según la reivindicación 28 o el ácido nucleico según la reivindicación 26 o 27.
30. Un proceso para producir un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que comprende cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 29 y recuperar el anticuerpo del cultivo.
- 15 31. Un proceso para producir un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-P-cadherina que comprende:
(a) unir químicamente SMCC a una porción farmacológica DM-1;
(b) conjugar dicho fármaco-conector con el anticuerpo recuperado del cultivo celular de la reivindicación 29; y
(c) purificar el conjugado de anticuerpo y fármaco.
- 20 32. Un proceso para producir un conjugado de fármaco y anticuerpo anti-P-cadherina que comprende:
(a) unir químicamente SMCC a una porción farmacológica DM-1;
(b) conjugar dicho fármaco-conector con el anticuerpo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 25; y
(c) purificar el conjugado de anticuerpo y fármaco.
- 25 33. El conjugado de anticuerpo y fármaco elaborado según la reivindicación 31 o 32, que tiene una relación fármaco/anticuerpo (RFA) promedio, medida con un espectrofotómetro UV, de aproximadamente 3,8.
- 30 34. Un reactivo de diagnóstico que comprende el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 25.
35. El reactivo de diagnóstico de la reivindicación 34, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo está marcado con un radiomarcador, un fluoróforo, un cromóforo, un agente de captura de imágenes o un ion metálico.

DIBUJOS

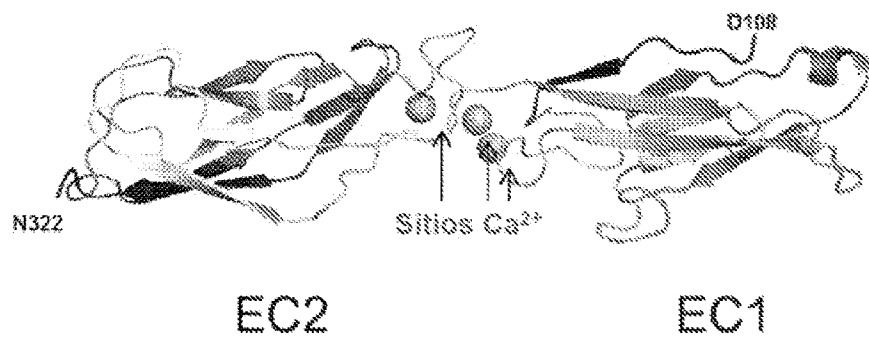


Figura 1

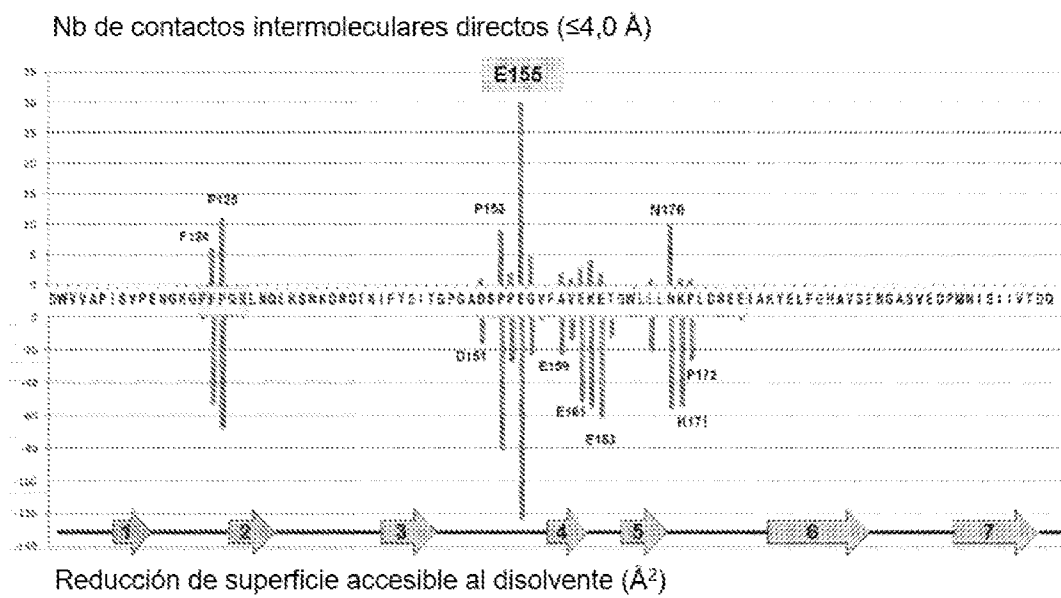


Figura 3

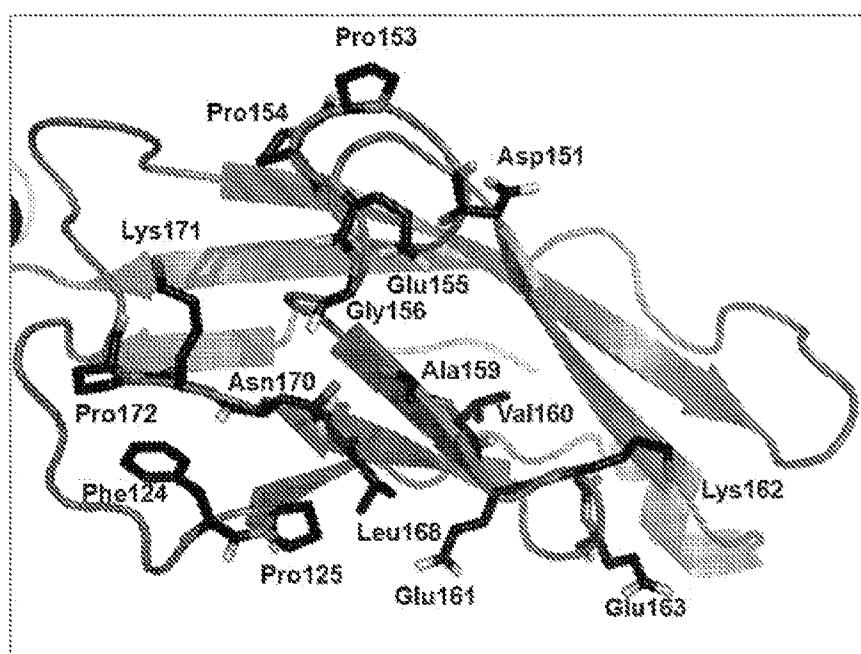


Figura 4

```

      100      120      ↓      ↓      130      140      150      ↓      ↓      160      ↓
humana DWVYAPISVPENGKGGFFQRLNQIKSNKDRDTKIFYSSITGPGADSPPEGVFAVEKETCWL
cyno   DWVYAPISVPENGKGGFFQRLNQIKSNKDRDTKIFYSSITGPGADSPPEGVFAVEKETCWL
      *****

      170      ↓      180      190      200      206
humana LNKPLDREXIAKYELFGHVSNGASVEDPMNISLIVTDQ
cyno   LNKPLDREXIAKYELFGHVSNGASVEDPMNISLIVTDQ
      *****

```

Figura 5

CADHERINA humana-1 CAGGKQKPTPTTILVQIKKNDK-EKVVFTSTTGGKLTTPVGVLTRETDNHSPTTFLD
 CADHERINA humana-2 LKSNKPTPTTILVQIPKDRK-MLNLYSVTPKPAKPTGKLTRETDNHSPTTFLD
 CADHERINA humana-3 116VFLGKQKPTPTTILVQIKKNDK-DTRIKYFTSTGGKLTTPVGVLTRETDNHSPTTFLD-174
 CADHERINA humana-4 VFGKQKPTPTTILVQIKKNDK-DTRIKYFTSTGGKLTTPVGVLTRETDNHSPTTFLD
 CADHERINA humana-5 TDRKQKPTPTTILVQIKKNDK-DTRIKYFTSTGGKLTTPVGVLTRETDNHSPTTFLD
 CADHERINA humana-6 LKSTTQKPTPTTILVQIKKNDK-DTRIKYFTSTGGKLTTPVGVLTRETDNHSPTTFLD
 CADHERINA humana-7 VFLGKQKPTPTTILVQIKKNDK-DTRIKYFTSTGGKLTTPVGVLTRETDNHSPTTFLD
 CADHERINA humana-8 VFLGKQKPTPTTILVQIKKNDK-DTRIKYFTSTGGKLTTPVGVLTRETDNHSPTTFLD
 CADHERINA humana-9 LKSTTQKPTPTTILVQIKKNDK-DTRIKYFTSTGGKLTTPVGVLTRETDNHSPTTFLD

Figura 6

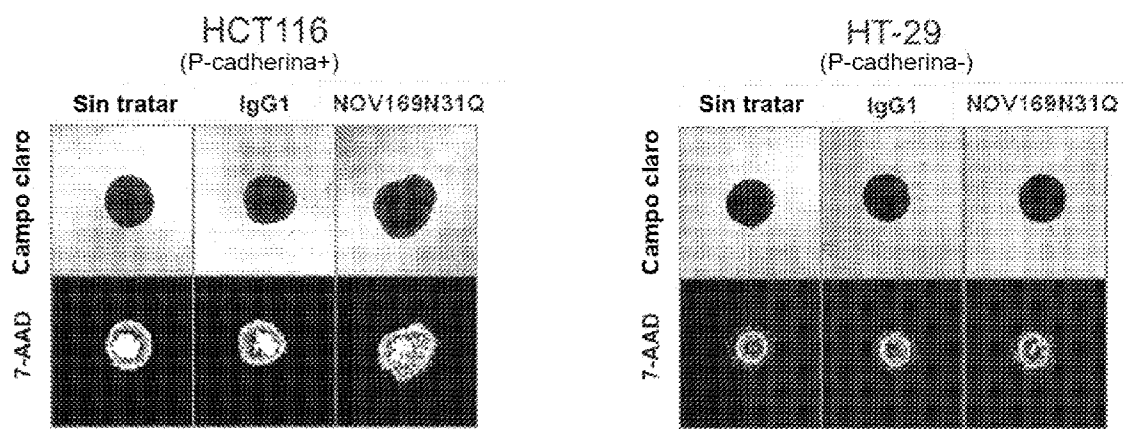


Figura 7

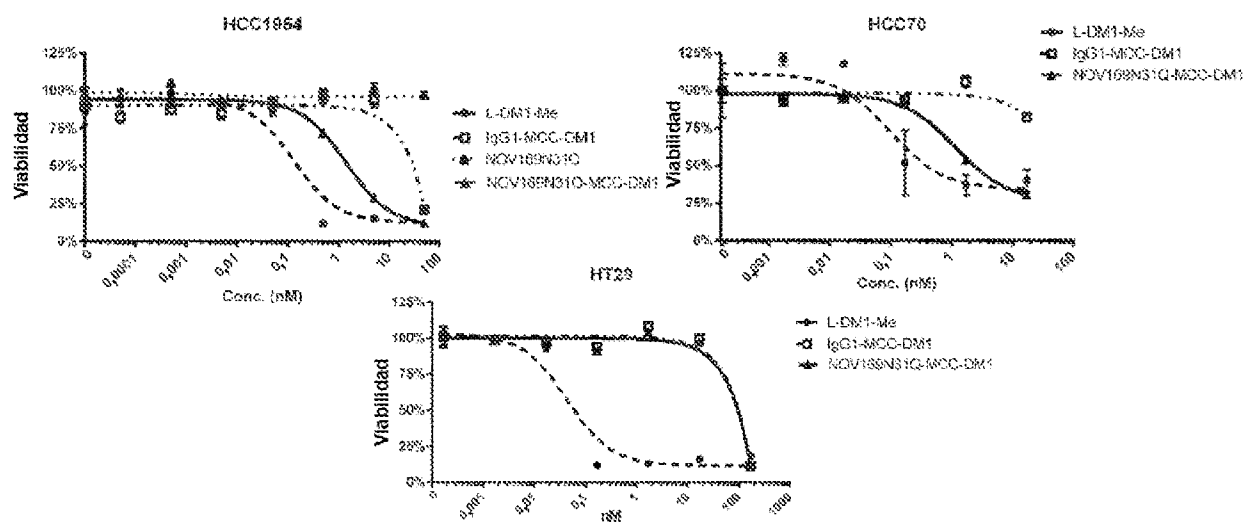


Figura 8

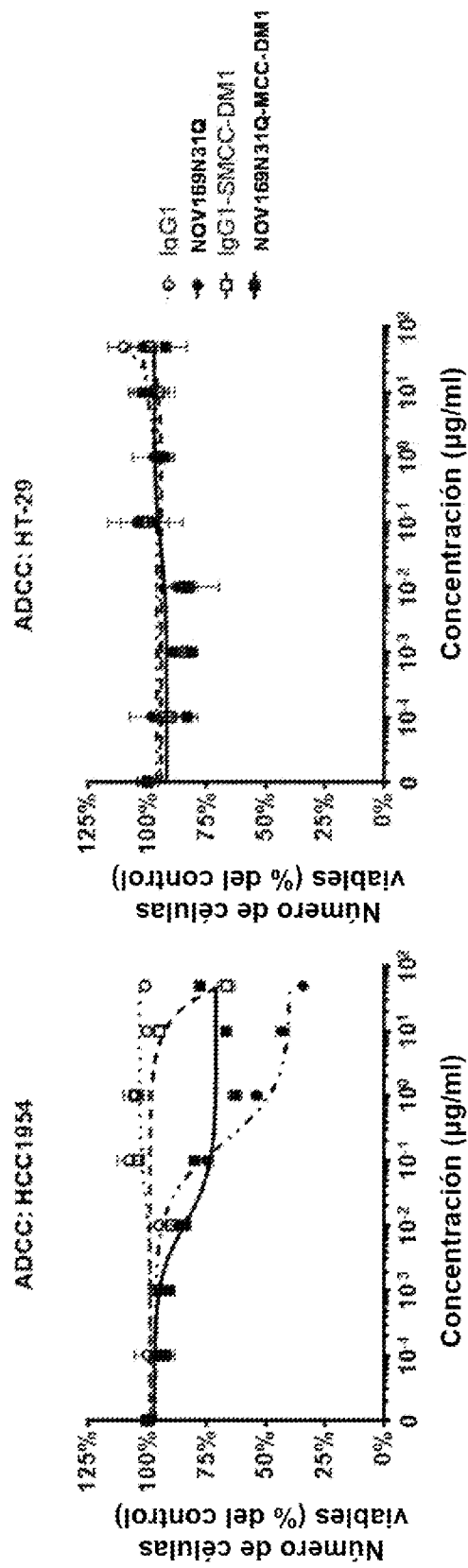


Figura 9

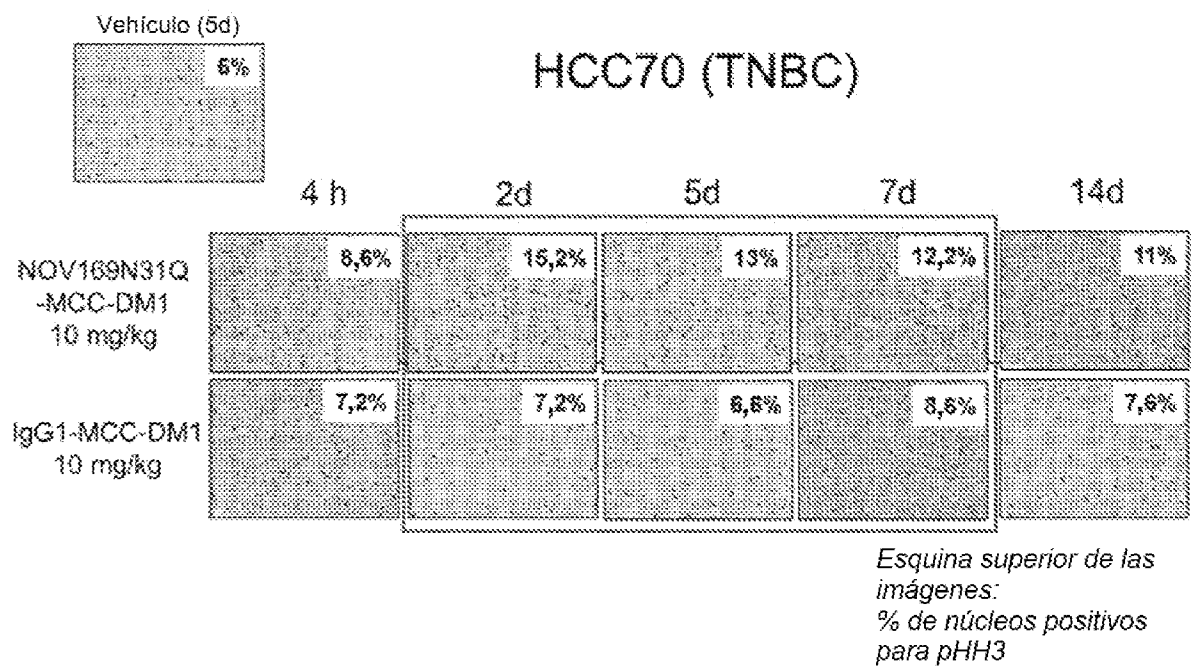


Figura 10

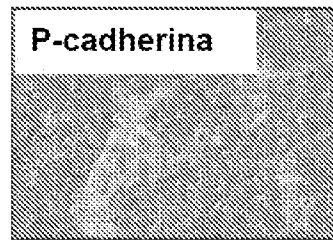


Figura 11A

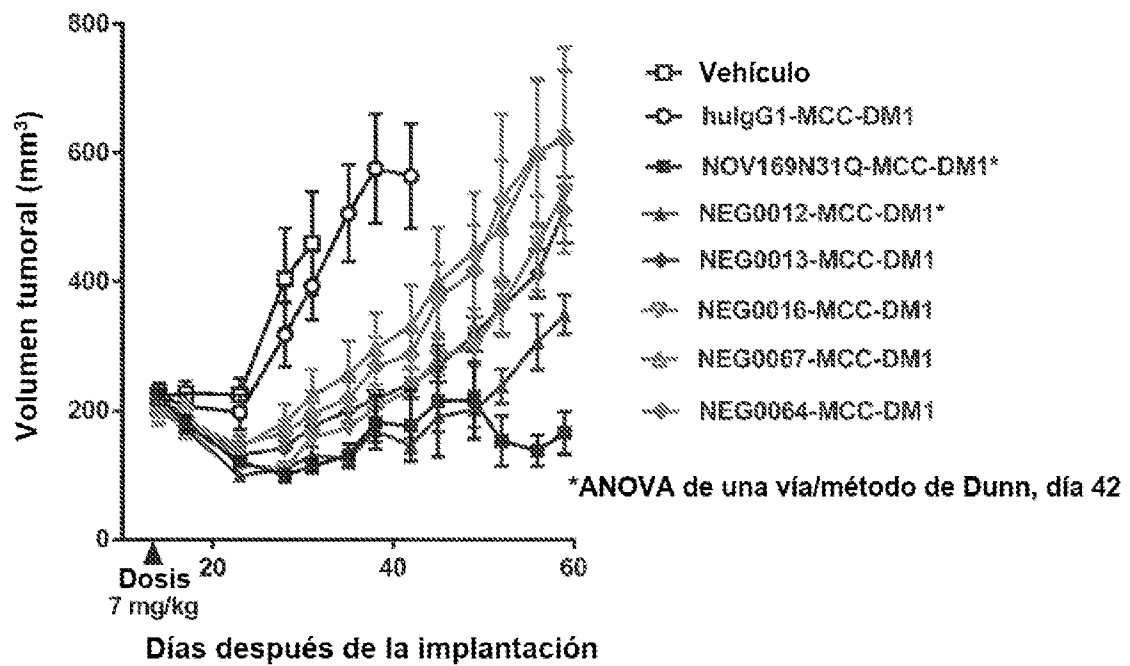


Figura 11B

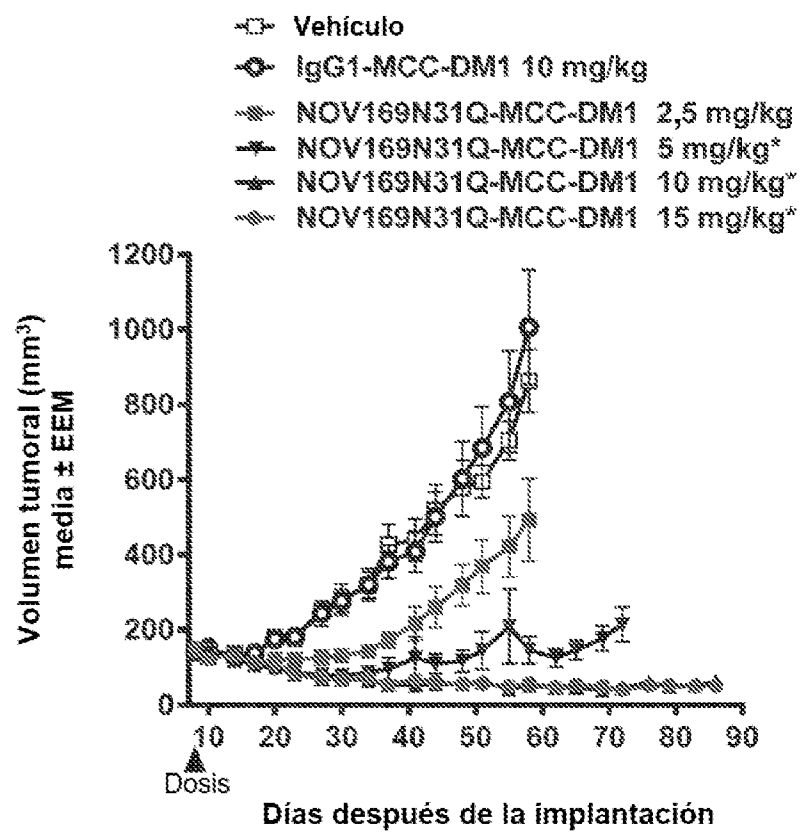


Figura 12

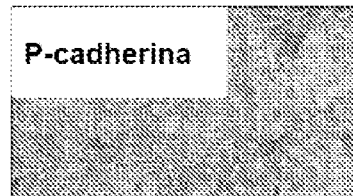


Figura 13A

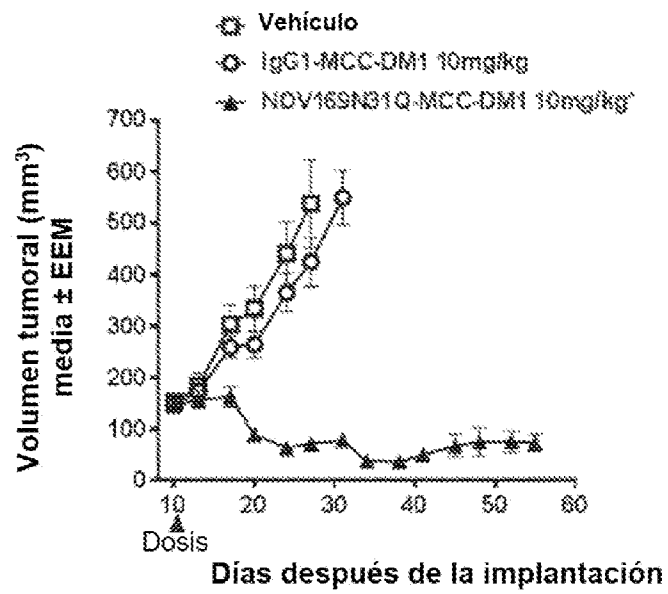


Figura 13B

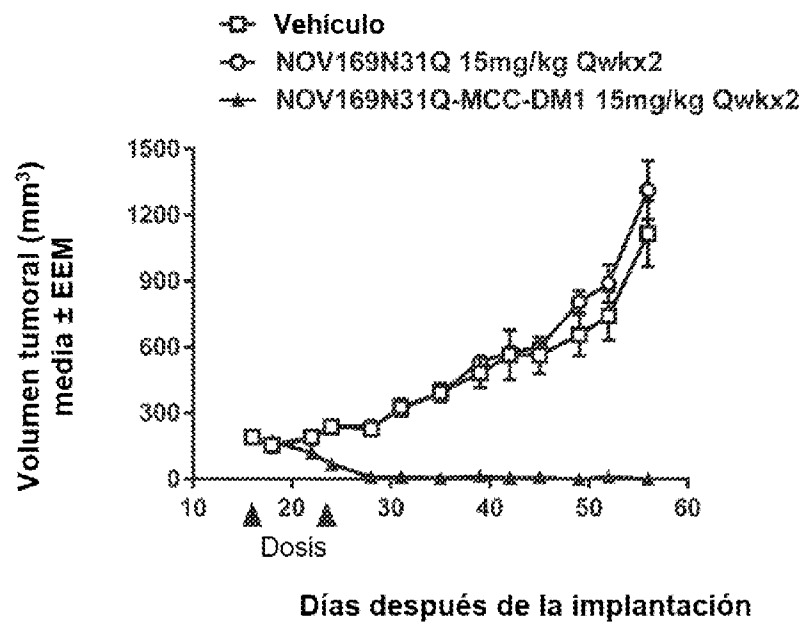


Figura 13C

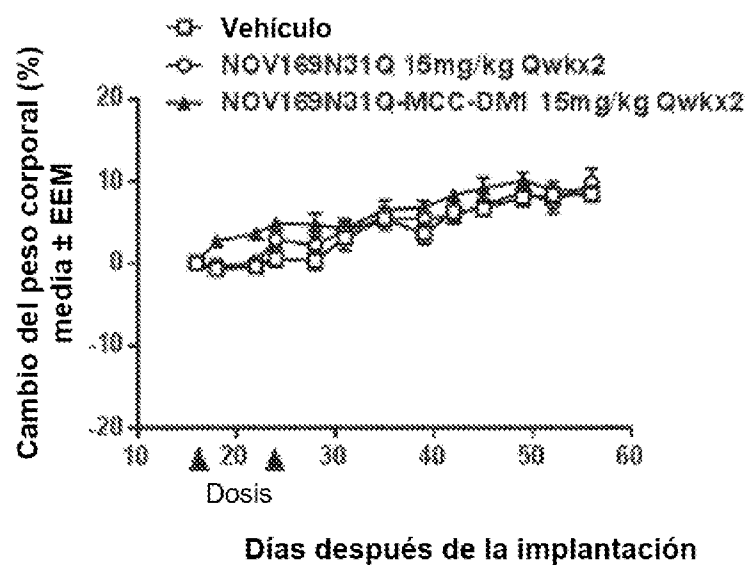


Figura 13D

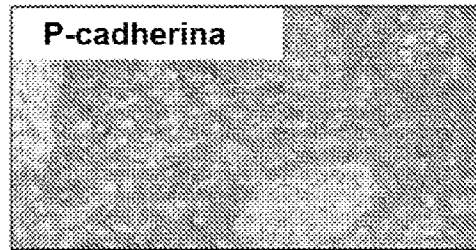


Figura 14A

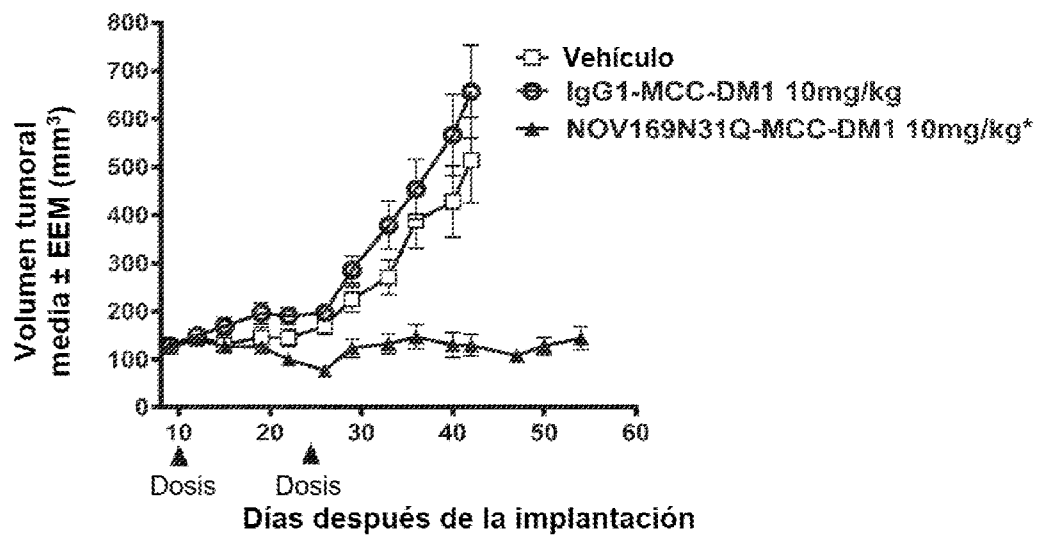


Figura 14B

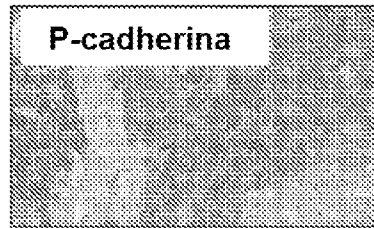


Figura 15A

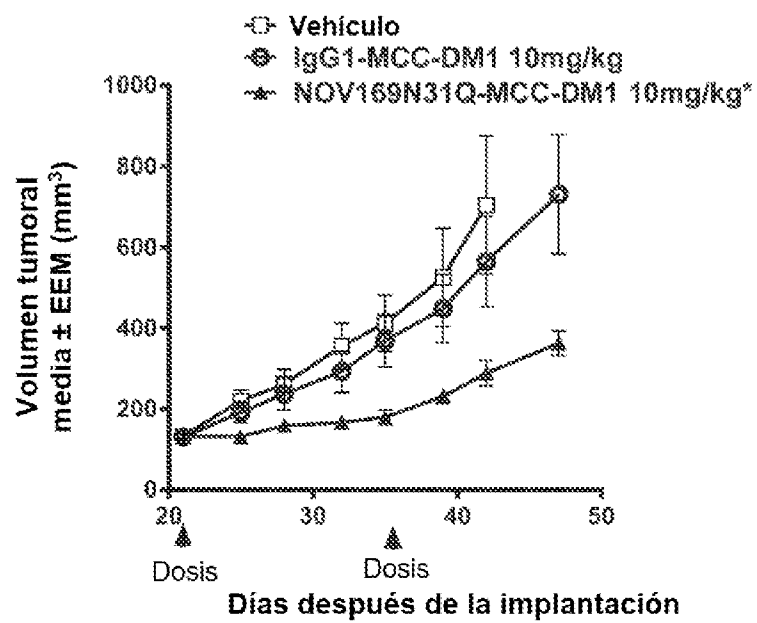


Figura 15B

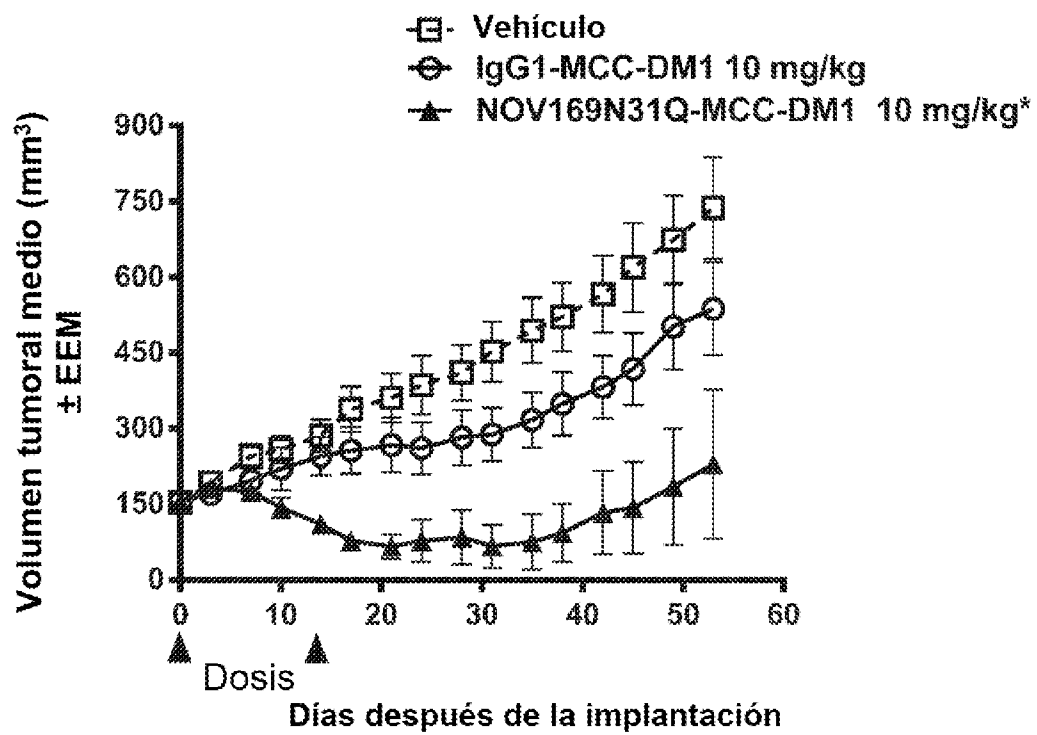


Figura 16

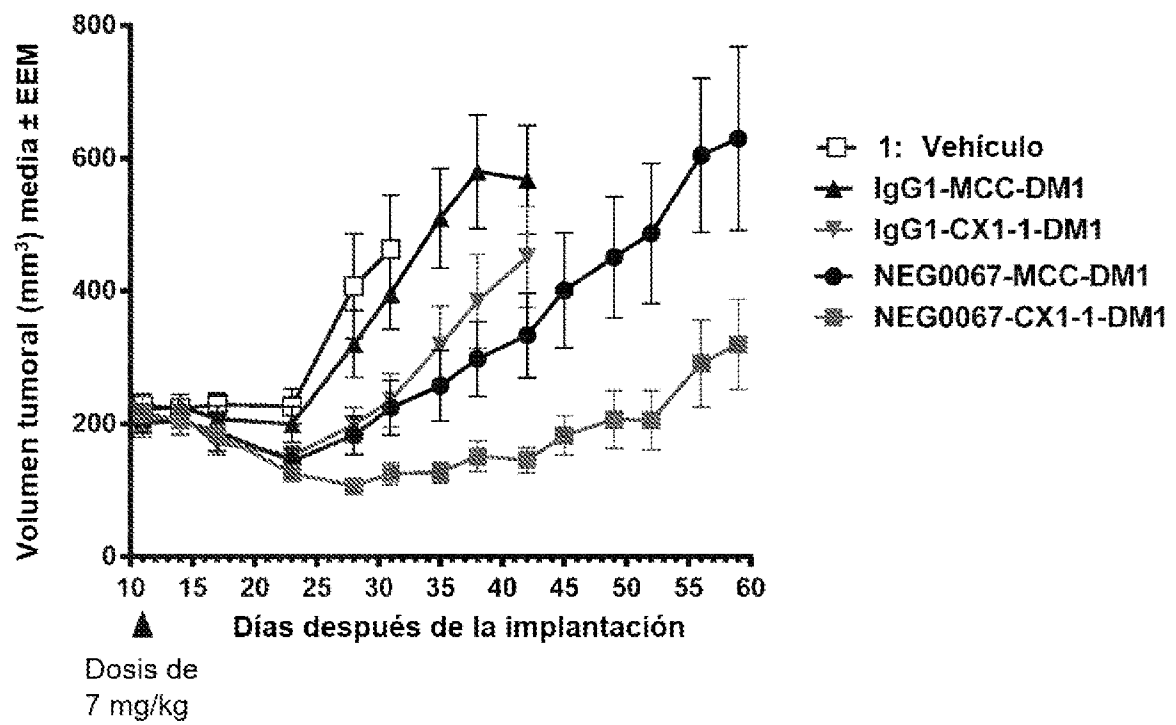


Figura 17

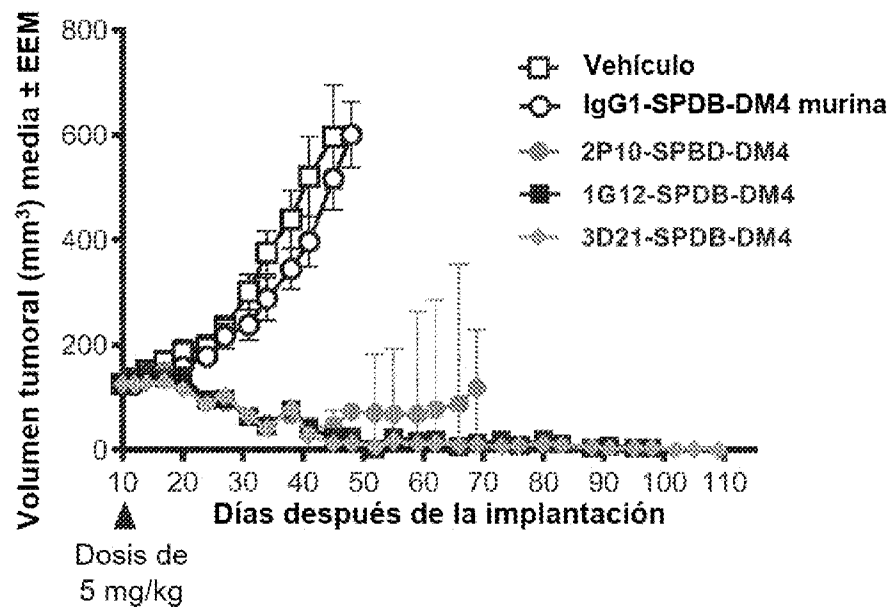


Figura 18