

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 017 207**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2020** **PCT/US2020/023981**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2020** **WO20191342**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2020** **E 20772686 (0)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024** **EP 3941946**

54 Título: **Anticuerpos para claudina-6 y conjugados de fármacos**

30 Prioridad:

20.03.2019 US 201962821391 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2025

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.00%)
1111 Franklin Street Twelfth Floor
Oakland, CA 94607-5200, US

72 Inventor/es:

CONKLIN, DYLAN;
MCDERMOTT, MARTINA, S.;
O'BRIEN, NEIL, A.;
PALAZZOLO, MICHAEL, J.;
SLAMON, DENNIS;
VON EUW, ERIKA y
BOWERS, PETER

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

Observaciones:

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

ES 3 017 207 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos para claudina-6 y conjugados de fármacos

5 **Antecedentes**

Los anticuerpos constituyen potentes agentes terapéuticos caracterizados por efectos secundarios limitados debido a su capacidad para seleccionar específicamente como diana un antígeno diferenciado en una célula, bacteria, virus o toxina. En 1986, se introdujo en el mercado el primer anticuerpo monoclonal terapéutico, Orthoclone OKT3. Desde entonces, esta clase de productos biofarmacéuticos ha crecido significativamente. A finales de 2014, cuarenta y siete productos de anticuerpos monoclonales habían recibido aprobación en EE. UU. o en Europa para el tratamiento de una variedad de enfermedades, incluyendo cáncer y enfermedades inflamatorias, cardiovasculares, respiratorias e infecciosas.

Actualmente existe más de una docena de anticuerpos monoclonales aprobados por la Food and Drug Administration de EE. UU. para tratar cánceres. Entre estos agentes se encuentran alemtuzumab (Campath®), que está indicado para leucemia linfocítica crónica (CLL), y trastuzumab (Herceptin®), que se utiliza para tratar cáncer de mama. Algunos anticuerpos están etiquetados como fármacos quimioterápicos, incluyendo, por ejemplo, brentuximab vedotina (Adcetris®) y Ado-trastuzumab emtansina (Kadcyla®). Otros productos de anticuerpos, tales como blinatumomab (Blinicyto) están diseñados para reconocer y unirse a dos antígenos diferentes. A pesar de la disponibilidad comercial de tales productos de anticuerpos, la incidencia de cáncer actual y las muertes por cáncer siguen siendo altas. Se ha notificado que la incidencia de cáncer es de más de 450 por cada 100,000 hombres y mujeres al año, y la mortalidad por cáncer está justo por encima de 170 por cada 100,000 hombres y mujeres al año. El documento WO 2015/014870 proporciona un método de tratamiento o prevención de cáncer que comprende inhibir y/o eliminar células madre cancerosas mediante administración de un anticuerpo que presenta la capacidad de unirse a CLDN6 a un paciente con cáncer.

Sumario

La presente invención se define por las reivindicaciones. Por lo tanto, la presente invención se refiere a un conjugado que comprende una proteína de unión a antígeno aislada que se une a claudina 6 o fragmento de unión a antígeno o variante de la misma, un agente citotóxico o un agente quimioterápico y un conector, en la que la proteína de unión a antígeno se selecciona de entre:

- (a) una proteína de unión a antígeno que comprende: (i) una CDR1 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de FTFSXYX (SEC ID n°: 455), en la que X en la posición 5 es N y X en la posición 7 es W; (ii) una CDR2 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de IRLKXDXYAT (SEC ID n°: 456), en la que X en la posición 5 es S y X en la posición 7 es N; (iii) una CDR3 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de XDGPPSGX (SEC ID n°: 457), en la que X en la posición 1 es N y X en la posición 8 es S; (iv) una CDR1 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de EXIYSY (SEC ID n°: 476), en la que X es N; (v) una CDR2 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de XAK (SEC ID n°: 477), en la que X en la posición 1 es N; y (vi) una CDR3 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de QXHYXVPWT (SEC ID n°: 454), en la que X en la posición 2 es H y X en la posición 5 es T; y
- (b) una proteína de unión a antígeno que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de cadena pesada (HC) de SEC ID n°: 23, 24 y 25, y las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de cadena ligera (LC) de SEC ID n°: 20, 21 y 22,

en la que el conector está entre el anticuerpo y el agente citotóxico o agente quimioterápico y el conector se selecciona de entre el grupo que consiste en VC-PAB, GGFG y CLA2.

Según una forma de realización preferida, el conjugado comprende VC-PAB-MMAE.

Según otra forma de realización preferida, la proteína es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno.

Según una forma de realización adicional preferida, la proteína es un anticuerpo monoclonal.

Según una forma de realización adicional preferida, la proteína es un anticuerpo humano, quimérico o humanizado.

Según una forma de realización preferida, la proteína es un anticuerpo humanizado que comprende la secuencia de dominio variable de cadena pesada tal como se proporciona en SEC ID n°: 387 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera tal como se proporciona en SEC ID n°: 389 o una variante que presenta por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos a la que se hace referencia.

La presente invención se refiere asimismo a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de la invención y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 5 La presente invención se refiere además al conjugado de la invención o a la composición farmacéutica de la invención para su utilización en el tratamiento de cáncer, inhibición de crecimiento tumoral, reducción de tamaño tumoral o prevención de la recidiva de cáncer.

Breve descripción de los dibujos

- 10 La figura 1 representa un gráfico de la expresión de CLDN6 en tejidos normales (no cancerosos).
- La figura 2 representa un gráfico de la expresión de CLDN6 en líneas celulares de cáncer tal como se determina mediante metodología de Agilent 44K.
- 15 La figura 3 representa un gráfico de la expresión de CLDN6 en líneas celulares de cáncer tal como se determina mediante RNASeq.
- La figura 4 representa un conjunto de imágenes de fluorescencia que representan la ubicación de CLDN6-GFP en diferentes modelos celulares.
- 20 La figura 5 representa una alineación de secuencias de CLDN6 humana, CLDN3 humana, CLDN4 humana, CLDN9 humana y CLDN6 de ratón. Se muestran las secuencias de EL1 y EL2.
- La figura 6A representa un gráfico de volumen tumoral (mm^3) de tumores en ratones portadores de tumores endometriales en función del tiempo (días) tras el tratamiento con anticuerpo de IgG2 de control, AB3, Ab1 de referencia, Ab2 de referencia, Ab3 de referencia, AB2 y AB3. La figura 6B representa un gráfico del cambio medio del volumen tumoral (mm^3) en el día 14 de tumores en ratones portadores de tumores endometriales tratados con anticuerpo de IgG2 de control, AB3, Ab1 de referencia, Ab2 de referencia, Ab3 de referencia, AB2 o AB3.
- 25 La figura 7A representa un gráfico de volumen tumoral (mm^3) de tumores en ratones portadores de tumores de vejiga en función del tiempo (días) tras el tratamiento con anticuerpo de IgG2 de control, AB3, Ab1 de referencia, Ab2 de referencia y AB3. La figura 7B representa un gráfico del cambio medio del volumen tumoral (mm^3) en el día 35 de tumores en ratones portadores de tumores de vejiga tratados con anticuerpo de IgG2 de control, AB3, Ab1 de referencia, Ab2 de referencia o AB3.
- 30 La figura 8A representa un gráfico de volumen tumoral (mm^3) de tumores en ratones portadores de tumores de ovarios en función del tiempo (días) tras el tratamiento con anticuerpo de IgG2 de control, AB3, Ab1 de referencia, AB2 y AB3. La figura 8B representa un gráfico del cambio medio del volumen tumoral (mm^3) en el día 20 de tumores en ratones portadores de tumores de ovarios tratados con anticuerpo de IgG2 de control, AB3, Ab1 de referencia, AB2 o AB3.
- 35 La figura 9A representa un gráfico de volumen tumoral (mm^3) de tumores en ratones portadores de tumores de melanoma en función del tiempo (días) tras el tratamiento con anticuerpo de IgG2 de control, AB3, Ab1 de referencia, Ab2 de referencia, Ab3 de referencia y AB3. La figura 9B representa un gráfico del cambio medio del volumen tumoral (mm^3) en el día 21 de tumores en ratones portadores de tumores de melanoma tratados con anticuerpo de IgG2 de control, AB3, Ab1 de referencia, Ab2 de referencia, Ab3 de referencia o AB3.
- 40 La figura 10A representa un gráfico del % de inhibición del crecimiento tumoral alcanzado en ratones portadores de tumor tratados con AB3, con respecto a ratones tratados con anticuerpo de control. La figura 10B representa una imagen de una inmunotransferencia western que demuestra los diferentes niveles de CLDN6 en líneas celulares de cáncer endometrial (ARK2), líneas celulares de cáncer de vejiga (UMUC4), líneas celulares de cáncer de ovarios (OV90) y líneas celulares de melanoma (M202) y células de control. Los niveles de α -tubulina fueron aproximadamente iguales, demostrando una carga de proteína igual.
- 45 La figura 11 representa un gráfico del % de cambio de peso corporal de ratones portadores de tumor tratados con control de vehículo, anticuerpo de control, Ab1 de referencia, Ab2 de referencia, Ab3 de referencia y AB3 en función del tiempo (días).
- 50 La figura 12A representa un gráfico de volumen tumoral (mm^3) de tumores en ratones portadores de tumores de ovarios en función del tiempo (días) tras el tratamiento con control de vehículo, anticuerpo de IgG2 de control, AB3, Ab1 de referencia, o uno de los anticuerpos anti-CLDN6 indicados. La figura 12B representa un gráfico del cambio medio del volumen tumoral (mm^3) en el día 28 de tumores en ratones portadores de tumores de ovarios tratados con control de vehículo, anticuerpo de IgG2 de control, AB3, Ab1 de referencia, o uno de los anticuerpos anti-CLDN6 indicados.
- 55
- 60
- 65

La figura 13 representa un gráfico del % de cambio de peso corporal de ratones portadores de tumor tratados con control de vehículo, anticuerpo de control, Ab1 de referencia y los anticuerpos anti-CLDN6 indicados en función del tiempo (días).

La figura 14 representa una serie de curvas de dosis-respuesta para varios anticuerpos anti-CLDN6 de la divulgación y Ab1 de referencia y referencia 2. Se utilizó IgG de ratón como control.

La figura 15A representa un gráfico del cambio medio del volumen tumoral (mm^3) en el día 35 de tumores en ratones portadores de tumores de vejiga tratados con control de vehículo, anticuerpo de IgG de control, una forma de ratón de AB3, una primera forma humanizada de AB3 y una segunda forma humanizada de AB3. La figura 15B representa un gráfico de los cambios del volumen tumoral (mm^3) para cada uno de los grupos en la figura 15A.

La figura 16A representa un gráfico del cambio medio del volumen tumoral (mm^3) en el día 35 de tumores en ratones portadores de tumores de vejiga tratados con control de vehículo, anticuerpo de IgG de control, una forma de ratón de AB3, una primera forma humanizada de AB3 y una segunda forma humanizada de AB3. Asimismo se someten a prueba dos anticuerpos de control (uno de ratón y uno quimérico) en este experimento. La figura 16B representa un gráfico de los cambios del volumen tumoral (mm^3) para cada uno de los grupos en la figura 16A.

La figura 17A representa un gráfico del cambio medio del volumen tumoral (mm^3) en el día 35 de tumores en ratones portadores de tumores de vejiga tratados con control de vehículo, anticuerpo de IgG de control, una forma de ratón de AB1 y una forma humanizada de AB1. La figura 17B representa un gráfico de los cambios del volumen tumoral (mm^3) para cada uno de los grupos en la figura 17A.

La figura 18A representa un gráfico del cambio medio del volumen tumoral (mm^3) en el día 35 de tumores en ratones portadores de tumores de vejiga tratados con control de vehículo, anticuerpo de IgG de control, una forma de ratón de AB4 y una forma humanizada de AB4. La figura 18B representa un gráfico de los cambios del volumen tumoral (mm^3) para cada uno de los grupos en la figura 18A.

La figura 19A representa un gráfico del cambio medio del volumen tumoral (mm^3) en el día 35 de tumores en ratones portadores de tumores de vejiga tratados con control de vehículo, anticuerpo de IgG de control, una forma de ratón de AB3, una forma quimérica de AB3, una primera forma humanizada de AB3, una segunda forma humanizada de AB3, una forma de ratón de Ab1, una forma humanizada de AB1, una forma de ratón de AB4, una forma humanizada de AB4 y asimismo se someten a prueba cuatro anticuerpos de control (un anticuerpo que presenta o bien una forma de ratón o bien una forma quimérica y un anticuerpo que presenta una forma de ratón o humana) en este experimento. La figura 19B representa un gráfico de los cambios del volumen tumoral (mm^3) para cada uno de los grupos en la figura 19A.

La figura 20 representa un gráfico del cambio medio del volumen tumoral (mm^3) en el día 55 de tumores en ratones portadores de tumores de vejiga tratados tal como se describe en la figura 19A.

La figura 21 representa un gráfico del % de cambio de peso corporal de ratones portadores de tumor tratados en el día 32 tratados tal como se describe en la figura 19A.

La figura 22 es un listado de secuencias de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de 12 anticuerpos frente a CLDN6 (denominados S1-S12) producidos y caracterizados. S1-S6 se basaron en una versión humanizada de AB3 (AB3-7 humanizado) y S7-S12 se basaron en una versión humanizada de AB1 (AB1-11 humanizado).

De la figura 23 a la figura 26 son ilustraciones esquemáticas de hipermutación somática (SHM) identificada mediante secuenciación de nueva generación (NGS) ejemplificativa de anticuerpos frente a CLDN6 de la presente divulgación. La figura 23 es la ilustración de un anticuerpo basado en AB-3 y SHM identificada mediante NGS en la cadena pesada. La figura 24 es la ilustración de un anticuerpo basado en AB-3 y SHM identificada mediante NGS en la cadena ligera. La figura 25 es la ilustración de un anticuerpo basado en AB-1 y SHM identificada mediante NGS en la cadena pesada. La figura 26 es la ilustración de un anticuerpo basado en AB-1 y SHM identificada mediante NGS en la cadena ligera. Se indican mutaciones en la numeración de Chothia.

La figura 27 es una tabla de resultados de ensayos de unión de FACS para anticuerpos S1-S12 basados en AB3-7 humanizado (AB S1-S6) o AB1-11 humanizado (AB S7-S12). Las concentraciones sometidas a prueba se muestran en la columna D.

La figura 28 es una tabla de resultados de ensayos de unión de FACS para anticuerpos S1-S12 a diversas concentraciones en diferentes líneas celulares.

La figura 29A es una ilustración de los tres tipos de N-glicanos (oligomanosa, compleja e híbrida) y símbolos habitualmente utilizados para tales sacáridos. La figura 29B es un diagrama de la ruta de rescate y la ruta *de novo* del metabolismo de fucosa. En la ruta de rescate, se convierte L-fucosa libre en GDP-fucosa, mientras que en la ruta *de novo*, se sintetiza GDP-fucosa mediante tres reacciones catalizadas por GMD y FX. Después se transporta GDP-fucosa desde el citosol hasta la luz del aparato de Golgi mediante GDP-Fuc transferasa y se transfiere a proteínas y oligosacáridos aceptores. El otro producto de reacción, GDP, se convierte mediante una nucleótido difosfatasa luminal en 5-monofosfato de guanosina (GMP) y fosfato inorgánico (Pi). El primero se exporta al citosol (mediante un sistema de contratransporte que está acoplado al transporte de GDP-fucosa), mientras que se postula que el segundo sale de la luz del aparato de Golgi mediante el canal de aniones de Golgi, GOLAC. Ver, por ejemplo, Nordeen *et al.* 2000; Hirschberg *et al.* 2001.

La figura 30 es un gráfico del volumen tumoral en ratones a los que se les inyectaron por vía subcutánea células cancerosas humanas seguido por tratamiento tal como se describe en la presente memoria.

La figura 31 es un gráfico del volumen tumoral en ratones a los que se les inyectaron por vía subcutánea células cancerosas humanas seguido por tratamiento tal como se describe en la presente memoria.

La figura 32 es un gráfico del volumen tumoral en ratones a los que se les inyectaron por vía subcutánea células cancerosas humanas seguido por tratamiento tal como se describe en la presente memoria.

La figura 33 es un gráfico del volumen tumoral en ratones a los que se les inyectaron por vía subcutánea células cancerosas humanas seguido por tratamiento tal como se describe en la presente memoria.

De la figura 34A a la figura 34H se representa la caracterización bioquímica de los conjugados de anticuerpo frente a CLDN6-fármaco (ADC) que comprenden AB3-7 (asimismo denominado AB23). La figura 34A es una tabla que resume las propiedades bioquímicas de los ADC frente a CLDN6. De la figura 34B a la figura 34H se representan cromatogramas de HIC-HPLC que muestran la abundancia relativa del anticuerpo conjugado a diferentes números de fármacos.

La figura 35 representa la integridad molecular de los ADC frente a CLDN6 que comprenden AB3-7 analizados mediante PAGE natural.

La figura 36 representa la actividad de unión (citometría de flujo) del conjugado de anticuerpo frente a CLDN6-fármaco (ADC) que comprende AB3-7 a células positivas para CLDN6 naturales o células que sobreexpresan artificialmente CLDN6.

La figura 37 representa la afinidad de unión de los ADC frente a CLDN6 que comprenden AB3-7 a células que expresan CLDN6. Las mediciones de KD (constante de disociación) se realizaron mediante KinExA 4000 (Sapidyne Instrument, Boise, Idaho) utilizando células HEK293T CLDN6-mGFP A11.

La figura 38 representa la caracterización *in vitro* de los ADC frente a CLDN6 que comprenden AB3-7. Los paneles demuestran la internalización celular de los ADC frente a CLDN6. H23-7 se refiere a AB3-7.

De la figura 39A a la figura 39N se representa la actividad anticancerosa *in vitro* de los ADC frente a CLDN6. De la figura 39A a la figura 39G se representa el efecto antiproliferativo en dos dimensiones (2D) de diferentes ADC frente a CLDN6 que comprenden AB-3-7 sobre células cancerosas: MC-VC-PAB-MMAE (convencional) (figura 39A); MC-VC-PAB-MMAE (tecnología de D4) (figura 39B); MC-GGFG-MMAE (tecnología de D4) (figura 39C); CL2A-SN38 (convencional) (figura 39D); CL2A-SN38 (tecnología de D4) (figura 39E); MC-GGFG-DXD (figura 39F); y MC-VC-PAB-DXD (figura 39G). De la figura 39H a la figura 39N se representa el efecto antiproliferativo en 2D de ADC-11 frente a CLDN6 (AB1-11 conjugado a VC-PAB-MMAE) sobre diferentes líneas celulares de cáncer: ARK2 (figura 39H); OVCA429 (figura 39I); H841 (figura 39J); OV90 (figura 39K); H1693 (figura 39L); M202 (figura 39M); y MCF7 (figura 39N).

La figura 40 representa la eficacia anticancerosa *in vivo* de ADC-11 frente a CLDN6 frente a xenoinjertos de línea celular de cáncer de ovarios positiva para CLDN6 (OV90).

De la figura 41A a la figura 41B se representa la ausencia de actividad anticancerosa de ADC-11 frente a CLDN6 frente a xenoinjertos de línea celular de cáncer de melanoma negativa para CLDN6 (M202).

De la figura 42A a la figura 42B se representa la eficacia anticancerosa *in vivo* del ADC-23 frente a CLDN6 (AB3-7-VC-PAB-MMAE) frente a xenoinjertos de línea celular de cáncer. La figura 42A representa la actividad anticancerosa de ADC-23 frente a CLDN6 frente a los xenoinjertos de línea celular de vejiga positiva para CLDN6 (UMUC4). La figura 42B representa la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de los tejidos de xenoinjerto recogidos en los puntos de tiempo indicados tras el tratamiento o bien con anticuerpo de control o bien con ADC-23 5 mg/kg.

De la figura 43A a la figura 43E se representa la eficacia anticancerosa *in vivo* del ADC-23 frente a CLDN6 frente a xenoinjertos derivados de paciente con cáncer de ovarios (PDX). La figura 43A se representa un panel de muestras de PDX de ovarios que se examinaron para detectar la expresión de CLDN6 mediante análisis por inmunotransferencia western. La figura 43B es un diagrama esquemático que muestra la inyección de las células de cáncer de ovarios de PDX transfectados con una enzima luciferasa en el espacio intraperitoneal de ratones inmunocomprometidos (NSG). De la figura 43C a la figura 43E se representa la tasa de supervivencia de los ratones tratados con ADC-23 frente a CLDN6 tal como se describe en la presente memoria.

De la figura 44A a la figura 44C se representa la eficacia anticancerosa dependiente de la dosis de ADC-23 frente a CLDN6 frente a xenoinjertos de línea celular de cáncer de ovarios positiva para CLDN6 (OV90). La figura 44A y la figura 44B representan la regresión del tamaño tumoral a la dosis y tiempo indicados. La figura 44C representa el porcentaje de cambio del peso corporal de ratones a los que se les administraron dosis de ADC-23 frente a CLDN6.

De la figura 45A a la figura 45C se muestra que no existe ninguna actividad inespecífica de ADC-23 frente a CLDN6 en xenoinjertos de línea celular de cáncer de melanoma negativa para CLDN6 (M202). La figura 45A y la figura 45B representan un cambio del volumen tumoral. El volumen tumoral representado en la figura 45B se tomó en el día 21. La figura 45C representa el porcentaje de cambio del peso corporal de los ratones a los que se les administraron dosis de ADC-23 frente a CLDN6.

Descripción detallada

La familia de claudina

Las uniones estrechas, asimismo conocidas como uniones de oclusión o zónulas ocluyentes, son estructuras de vertebrados ubicadas entre dos células adyacentes que regulan la permeabilidad paracelular y conservan la polaridad celular en láminas de células epiteliales y endoteliales. La familia de genes de claudina (CLDN) codifica proteínas de membrana que son componentes importantes de uniones estrechas. Las proteínas CLDN comprenden cuatro hélices transmembranarias (TM) (TM1, TM2, TM3, y TM4) y dos bucles extracelulares (EL1 y EL2). Los bucles extracelulares de las proteínas CLDN de células adyacentes interactúan entre sí para sellar la lámina celular y regular el transporte paracelular entre los espacios luminal y basolateral.

Las proteínas CLDN desempeñan una función en diversas enfermedades y patologías humanas. Por ejemplo, se ha mostrado que mutaciones en el gen *CLDN1* dan como resultado una descamación progresiva de la piel junto con una obstrucción de conductos biliares. Mutantes del gen *CLDN16* provocan un trastorno de reducción de magnesio. Las mutaciones de *CLDN19* conducen a estados oculares, tales como colobomas macular y miopía, mientras que las mutaciones de *CLDN14* pueden conducir a sordera recesiva no sindrómica. Es conocido que CLDN3 y CLDN4 son receptores de superficie para la enterotoxina de *Clostridium perfringens* en el intestino, y CLDN1, CLDN6 y CLDN9 son correceptores para la entrada de virus de la hepatitis C (VHC). Se ha mostrado que varias proteínas CLDN se expresan de manera anómala en cánceres. Por ejemplo, CLDN1 está regulada por disminución en cáncer de mama y de colon, mientras que CLDN3 y CLDN4 están altamente reguladas por incremento en múltiples cánceres.

La claudina-6 (CLDN6) es un miembro de la familia de CLDN. El gen que codifica la proteína CLDN6 humana está ubicado en el brazo p del cromosoma humano 16 en 16p13.3 y está conservado en chimpancé, macaco *rhesus*, perro, vaca, ratón, rata, pez cebra y rana. La CLDN6 se expresa generalmente en seres humanos como una proteína precursora de 220 aminoácidos; los primeros 21 aminoácidos de la cual constituyen el péptido señal. La secuencia de aminoácidos de la proteína precursora de CLDN6 está públicamente disponible en el sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) como secuencia de referencia de NCBI NP_067018.2 y se proporciona en la presente memoria como SEC ID n°: 1. El aminoácido en la posición 143 de SEC ID n°: 1 es Ile. En algunos casos, debido a un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la secuencia de ADN que codifica CLDN6, el aminoácido en la posición 143 es una Val. La secuencia de aminoácidos de CLDN6 humana que presenta una Val en la posición 143 se proporciona en la presente memoria como SEC ID n°: 178.

Proteínas de unión a antígeno

En la presente memoria se proporcionan proteínas de unión a antígeno que se unen a claudina-6 (CLDN6). Las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación pueden adoptar una cualquiera de muchas formas de proteínas de unión a antígeno conocidas en la materia. En diversas puestas en práctica, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación adoptan la forma de un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, o un producto de proteína de anticuerpo.

En diversas puestas en práctica de la presente divulgación, la proteína de unión a antígeno comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, un anticuerpo. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que presenta un formato de inmunoglobulina convencional, que comprende cadenas pesada y ligera, y que comprende regiones variable y constante. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser una IgG

que es una estructura “en forma de Y” de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, presentando cada par una cadena “ligera” (que presenta normalmente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una “pesada” (que presenta normalmente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Un anticuerpo presenta una región variable y una región constante. En formatos de IgG, generalmente la región variable presenta aproximadamente 100-110 o más aminoácidos, comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), es principalmente responsable del reconocimiento de antígeno, y varía sustancialmente con respecto a otros anticuerpos que se unen a antígenos diferentes. La región constante permite al anticuerpo reclutar células y moléculas del sistema inmunitario. La región variable está compuesta por las regiones N-terminales de cada cadena ligera y cadena pesada, mientras que la región constante está compuesta por las porciones C-terminales de cada una de las cadenas pesada y ligera (Janeway *et al.*, “Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes”, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4ª ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999)).

La estructura general y propiedades de las CDR de anticuerpos se han descrito en la materia. En resumen, en un armazón de anticuerpo, las CDR están incorporadas dentro de un entramado en la región variable de cadena pesada y ligera en el que constituyen las regiones ampliamente responsables de unión y reconocimiento de antígeno. Una región variable comprende normalmente por lo menos tres CDR de cadena pesada o ligera (Kabat *et al.*, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.; ver asimismo Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia *et al.*, 1989, Nature 342: 877-883), dentro de una región de entramado (denominada regiones de entramado 1-4, FR1, FR2, FR3, y FR4, por Kabat *et al.*, 1991; ver asimismo Chothia y Lesk, 1987, citado anteriormente).

Los anticuerpos pueden comprender cualquier región constante conocida en la materia. Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG presenta varias subclases, incluyendo, pero sin limitarse a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM presenta subclases, incluyendo, pero sin limitarse a, IgM1 e IgM2. Las puestas en práctica de la presente divulgación incluyen todas de tales clases o isotipos de anticuerpos. La región constante de cadena ligera puede ser, por ejemplo, una región constante de cadena ligera de tipo kappa o lambda, por ejemplo, una región constante de cadena ligera de tipo kappa o lambda humana. La región constante de cadena pesada puede ser, por ejemplo, regiones constantes de cadena pesada de tipo alfa, delta, épsilon, gamma o mu, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de tipo alfa, delta, épsilon, gamma o mu humana. Por lo tanto, en diversas puestas en práctica, el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM, incluyendo una cualquiera de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En diversos aspectos, el anticuerpo comprende una región constante que comprende una o más modificaciones de aminoácido, con respecto al homólogo que se produce de manera natural, con el fin de mejorar la semivida/estabilidad o hacer que el anticuerpo sea más adecuado para la expresión/facilidad de producción. En diversos casos, el anticuerpo comprende una región constante en la que se retira o recorta el residuo de Lys C-terminal que está presente en el homólogo que se produce de manera natural.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. En algunas puestas en práctica, el anticuerpo comprende una secuencia que es sustancialmente similar a un anticuerpo que se produce de manera natural producido por un mamífero, por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, ser humano y similares. Con respecto a esto, puede considerarse que el anticuerpo es un anticuerpo de mamífero, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, anticuerpo de conejo, anticuerpo de cabra, anticuerpo de caballo, anticuerpo de pollo, anticuerpo de hámster, anticuerpo humano y similares. En determinados aspectos, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo, tal como un anticuerpo humano. En determinados aspectos, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. El término “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo que contiene dominios de dos o más anticuerpos diferentes. Un anticuerpo quimérico puede contener, por ejemplo, los dominios constantes de una especie y los dominios variables de una segunda, o, más generalmente, puede contener tramos de secuencia de aminoácidos de por lo menos dos especies. Un anticuerpo quimérico asimismo puede contener dominios de dos o más anticuerpos diferentes dentro de la misma especie. El término “humanizado”, cuando se utiliza con respecto a anticuerpos, se refiere a anticuerpos que presentan por lo menos regiones de CDR de una fuente no humana que se modifican por ingeniería para presentar una estructura y función inmunológica más similar a anticuerpos humanos verdaderos que los anticuerpos de fuente originales. Por ejemplo, la humanización puede implicar injertar una CDR de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón, en un anticuerpo humano. La humanización asimismo puede implicar seleccionar sustituciones de aminoácido para hacer que una secuencia no humana sea más similar a una secuencia humana. Existe información, incluyendo información de secuencia para regiones constantes de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos humanos, públicamente disponible mediante la base de datos Uniprot así como otras bases de datos bien conocidas por los expertos en el campo de diseño por ingeniería y producción de anticuerpos. Por ejemplo, la región constante de IgG2 está disponible de la base de datos Uniprot con el número de Uniprot P01859.

Un anticuerpo puede escindirse para proporcionar fragmentos mediante enzimas, tales como, por ejemplo, papaína y pepsina. La papaína escinde un anticuerpo para producir dos fragmentos Fab y un único fragmento Fc. La pepsina escinde un anticuerpo para producir un fragmento F(ab')₂ y un fragmento pFc'. En diversos aspectos de la presente divulgación, la proteína de unión a antígeno de la presente divulgación es un fragmento de unión a

antígeno de un anticuerpo (asimismo conocido como fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, fragmento de unión a antígeno, porción de unión a antígeno). En diversos casos, el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno es un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂.

La arquitectura de anticuerpos se ha aprovechado para crear una gama creciente de formatos de anticuerpos alternativos que comprende un intervalo de peso molecular de por lo menos aproximadamente 12-150 kDa y presenta un intervalo de valencia (n) de desde monomérico (n = 1), hasta dimérico (n = 2), hasta trimérico (n = 3), hasta tetramérico (n = 4), y posiblemente superior; tales formatos de anticuerpos alternativos se denominan en la presente memoria "productos de proteína de anticuerpo". Los productos de proteína de anticuerpo incluyen aquellos basados en la estructura de anticuerpo completo y los que imitan fragmentos de anticuerpo que conservan una capacidad de unión a antígeno completa, por ejemplo, scFv, Fab y VHH/VH (expuestos a continuación). El fragmento de unión a antígeno más pequeño que conserva su sitio de unión a antígeno completo es el fragmento Fv, que consiste completamente en regiones variables (V). se utiliza un conector peptídico de aminoácidos flexibles, soluble, para conectar las regiones V a un fragmento scFv (fragmento variable de cadena sencilla) para la estabilización de la molécula, o se añaden los dominios constantes (C) a las regiones V para generar un fragmento Fab [fragmento de unión a antígeno]. Tanto los fragmentos scFv como Fab pueden producirse fácilmente en células huésped, por ejemplo, células huésped procariotas. Otros productos de proteína de anticuerpo incluyen scFv estabilizados por enlaces disulfuro (ds-scFv), Fab de cadena sencilla (scFab), así como formatos de anticuerpos di- y multiméricos tales como di-, tri- y tetracuerpos, o minicuerpos (miniAc) que comprenden diferentes formatos que consisten en scFv unidos a dominios de oligomerización. Los fragmentos más pequeños son VHH/VH de Ac de cadena pesada de camélidos así como Ac de dominio simple (sdAb). El elemento estructural que se utiliza más habitualmente para crear formatos de anticuerpos novedosos es el fragmento de anticuerpo de dominio variable (V) de cadena sencilla (scFv), que comprende dominios V de la cadena pesada y ligera (dominio VH y VL) unidos mediante un conector peptídico de ~15 residuos de aminoácido. Un peptidocuerpo o fusión de péptido-Fc es aún otro producto de proteína de anticuerpo. La estructura de un peptidocuerpo consiste en un péptido biológicamente activo injertado en un dominio de Fc. Los peptidocuerpos están bien descritos en la materia. Ver, por ejemplo, Shimamoto *et al.*, mAbs 4(5): 586-591 (2012).

Otros productos de proteína de anticuerpo incluyen un anticuerpo de cadena sencilla (SCA); un diacuerpo; un triacuerpo; un tetracuerpo; anticuerpos biespecíficos o triespecíficos y similares. Los anticuerpos biespecíficos pueden dividirse en cinco clases principales: BslgG, IgG asociada, fragmentos de anticuerpo biespecífico (BsAb), proteínas de fusión biespecíficas y conjugados de BsAb. Ver, por ejemplo, Spiess *et al.*, Molecular Immunology 67(2) Part A: 97-106 (2015).

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno de la presente divulgación comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, uno cualquiera de estos productos de proteína de anticuerpo. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno de la presente divulgación comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, uno cualquiera de un scFv, Fab VHH/VH, fragmento Fv, ds-scFv, scFab, anticuerpo dimérico, anticuerpo multimérico (por ejemplo, un diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo), miniAc, peptidocuerpo VHH/VH de anticuerpo de cadena pesada de camélido, sdAb, diacuerpo; un triacuerpo; un tetracuerpo; un anticuerpo biespecífico o triespecífico, BslgG, IgG asociada, fragmento de BsAb, proteína de fusión biespecífica y conjugado de BsAb.

En diversos casos, la proteína de unión a antígeno de la presente divulgación es un producto de proteína de anticuerpo en forma monomérica, o forma polimérica, oligomérica o multimérica. En determinadas puestas en práctica en las que el anticuerpo comprende dos o más fragmentos de regiones de unión a antígeno diferenciados, se considera que el anticuerpo es biespecífico, triespecífico o multiespecífico, o bivalente, trivalente o multivalente, dependiendo del número de epítomos distintos que se reconocen por, y a los que se une, el anticuerpo.

En diversas puestas en práctica, un anticuerpo anti-CLDN6 o variante de anticuerpo del mismo se selecciona de entre el grupo que consiste en un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante, un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo monomérico, un diacuerpo, un triacuerpo, un tetracuerpo, un fragmento Fab, un anticuerpo de IgG1, un anticuerpo de IgG2, un anticuerpo de IgG3 y un anticuerpo de IgG4.

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno de la presente divulgación está unida a un agente terapéutico. Tal como se describe a continuación, el agente terapéutico puede ser cualquiera conocido en la materia, incluyendo, pero sin limitarse a, agentes quimioterápicos, citocinas y factores de crecimiento, agentes citotóxicos y similares. Ver "Conjugados" a continuación.

CLDN6 y epítomos

Las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación se unen a CLDN6. En diversos aspectos, la CLDN6 es una CLDN6 humana que presenta la secuencia de aminoácidos de:

MASAGMQILGVVLTLLGWVNGLVSCALPMWKVTAFIGNSIVVAQV
VWEGWLMSCVVQSTGQMCKVYDSLLALPQDLQAARALCVIALL
VALFGLLVYLAGAKCTTCVEEKDSKARLVLTSGIVFVISGVLTLPVC
WTAHAXIRDFYNPLVAEAQKREL GASLYLGWAASGLLLGGGLLC

CTCPSGGSQGPSHYMARYSTSAPAIRGPSEYPTKNYV, en la que X es Ile o Val (SEC ID nº: 202).

- 5 En diversos aspectos, la CLDN6 humana comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEC ID nº: 1, 178 y 200-202.

En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación se unen a un epítipo dentro de una secuencia de aminoácidos de CLDN6. En diversos aspectos, la CLDN6 es una CLDN6 humana y las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación se unen a un epítipo dentro de una secuencia de aminoácidos de CLDN6 humana, por ejemplo, SEC ID nº: 1, 178 y 200-202. Por "epítipo" se pretende hacer referencia a la región de, o dentro de, CLDN6 a la que se une la proteína de unión a antígeno. En algunas puestas en práctica, el epítipo es un epítipo lineal. "Epítipo lineal" se refiere a la región de, o dentro de, la CLDN6 a la que se une la proteína de unión a antígeno y región que está compuesta por aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de la CLDN6. Los aminoácidos de un epítipo lineal están adyacentes entre sí en la estructura primaria de la CLDN6. Por lo tanto, un epítipo lineal es un fragmento o porción de la secuencia de aminoácidos del antígeno, es decir, CLDN6. En otras diversas puestas en práctica, el epítipo es un epítipo conformacional o estructural. Por "epítipo conformacional" o "epítipo estructural" se pretende hacer referencia a un epítipo que está compuesto por aminoácidos que están ubicados en estrecha proximidad entre sí únicamente cuando la CLDN6 está en su estado plegado de manera apropiada. A diferencia de los epítipos lineales, los aminoácidos de un epítipo conformacional o estructural no están adyacentes entre sí en la estructura primaria (es decir, secuencia de aminoácidos) de la CLDN6. Un epítipo conformacional o estructural no está compuesto por aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos del antígeno (CLDN6).

En diversos aspectos, el epítipo está ubicado dentro del dominio extracelular (ECD) de CLDN6, por ejemplo, CLDN6 humana. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno se une al bucle extracelular 2 (EL2) del ECD de CLDN6 que presenta la secuencia de aminoácidos de WTAHAIRDFYNPLVAEAQKREL (SEC ID nº: 2). En diversos aspectos, el epítipo al que se une la proteína de unión a antígeno está dentro de SEC ID nº: 2. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno de la presente divulgación se une a una porción N-terminal de SEC ID nº: 2, por ejemplo, TAAHAIRDFYNPL (SEC ID nº: 3). En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno de la presente divulgación se une a una porción C-terminal de SEC ID nº: 2, por ejemplo, LVAEAQKREL (SEC ID nº: 4). En diversos casos, la proteína de unión a antígeno de la presente divulgación se une a EL2, pero no al bucle extracelular 1 (EL1) de CLDN6. En diversos aspectos, el/los epítipo(s) al/a los que se unen las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación es/son diferente(s) del epítipo al que se une un anticuerpo anti-CLDN6 que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID nº: 185 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID nº: 186. En diversos aspectos, el/los epítipo(s) al/a los que se unen las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación es/son diferente(s) del epítipo al que se une un anticuerpo anti-CLDN6 que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de SEC ID nº: 181 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de SEC ID nº: 182.

En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno se unen a CLDN6 humana y a una CLDN6 no humana. En diversos casos, la CLDN6 no humana es una CLDN6 de chimpancé, macaco *rhesus*, perro, vaca, ratón, rata, pez cebra o rana. En diversos casos, las proteínas de unión a antígeno se unen a CLDN6 humana y CLDN6 de ratón.

Afinidad y avidéz

Las proteínas de unión a antígeno proporcionadas en la presente memoria se unen a CLDN6 de una manera no covalente y reversible. En diversas puestas en práctica, la fuerza de unión de la proteína de unión a antígeno a CLDN6 puede describirse en cuanto a su afinidad, una medida de la fuerza de interacción entre el sitio de unión de la proteína de unión a antígeno y el epítipo. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno proporcionadas en la presente memoria presentan una alta afinidad por CLDN6 y, por tanto, se unirán a una mayor cantidad de CLDN6 en un periodo de tiempo más corto que proteínas de unión a antígeno de baja afinidad. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno presenta una constante de asociación en equilibrio, K_A , que es de por lo menos 10^5 mol^{-1} , por lo menos 10^6 mol^{-1} , por lo menos 10^7 mol^{-1} , por lo menos 10^8 mol^{-1} , por lo menos 10^9 mol^{-1} o por lo menos 10^{10} mol^{-1} o por lo menos 10^{10} mol^{-1} , por lo menos 10^{10} mol^{-1} . Tal como aprecia el experto ordinario en la materia, K_A puede resultar influida por factores incluyendo pH, temperatura y composición de tampón.

En diversas puestas en práctica, la fuerza de unión de la proteína de unión a antígeno a CLDN6 puede describirse

en cuanto a su sensibilidad. K_D es la constante de disociación en equilibrio, una razón de k_{off}/k_{on} , entre la proteína de unión a antígeno y CLDN6. K_D y K_A están inversamente relacionadas. El valor de K_D se refiere a la concentración de la proteína de unión a antígeno (la cantidad de proteína de unión a antígeno necesaria para un experimento particular) y, por tanto, cuanto menor es el valor de K_D (concentración menor) mayor es la afinidad de la proteína de unión a antígeno. En diversos aspectos, la fuerza de unión de la proteína de unión a antígeno a CLDN6 puede describirse en cuanto a K_D . En diversos aspectos, la K_D de las proteínas de unión a antígeno proporcionadas en la presente memoria es de aproximadamente 10^{-1} , aproximadamente 10^{-2} , aproximadamente 10^{-3} , aproximadamente 10^{-4} , aproximadamente 10^{-5} , aproximadamente 10^{-6} o menos. En diversos aspectos, la K_D de las proteínas de unión a antígeno proporcionadas en la presente memoria es micromolar, nanomolar, picomolar o femtomolar. En diversos aspectos, la K_D de las proteínas de unión a antígeno proporcionadas en la presente memoria está dentro de un intervalo de aproximadamente 10^{-4} a 10^{-6} o de 10^{-7} a 10^{-9} o de 10^{-10} a 10^{-12} o de 10^{-13} a 10^{-15} . En diversos aspectos, la K_D de las proteínas de unión a antígeno proporcionadas en la presente memoria está dentro de un intervalo de aproximadamente 1.0×10^{-12} M a aproximadamente 1.0×10^{-8} M. En diversos aspectos, la K_D de las proteínas de unión a antígeno está dentro de un intervalo de aproximadamente 1.0×10^{-11} M a aproximadamente 1.0×10^{-9} M.

En diversos aspectos, la afinidad de las proteínas de unión a antígeno se mide o clasifica utilizando un ensayo basado en citometría de flujo o en clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Los ensayos de unión basados en citometría de flujo se conocen en la materia. Ver, por ejemplo, Cedeno-Arias *et al.*, Sci Pharm 79(3): 569-581 (2011); Rathanaswami *et al.*, Analytical Biochem 373: 52-60 (2008); y Geuijen *et al.*, J Immunol Methods 302(1-2): 68-77 (2005). En diversos aspectos, la afinidad de las proteínas de unión a antígeno se mide o clasifica utilizando un ensayo de competición tal como se describe en Trikha *et al.*, Int J Cancer 110: 326-335 (2004) y Tam *et al.*, Circulation 98(11): 1085-1091 (1998), así como a continuación. Ver la sección titulada "Ensayos de competición" a continuación. En Trikha *et al.*, se utilizaron células que expresan el antígeno en un radioensayo. La unión de proteína de unión a antígeno marcada con ^{125}I (por ejemplo, anticuerpo) al antígeno de superficie celular se mide con las células en suspensión. En diversos aspectos, la afinidad relativa de un anticuerpo frente a CLDN6 se determina mediante un ensayo basado en FACS en el que se incuban diferentes concentraciones de un anticuerpo frente a CLDN6 conjugado a un fluoróforo con células que expresan CLDN6 y se determina la fluorescencia emitida (que es una medida directa de la unión anticuerpo-antígeno). Se realiza una curva que representa gráficamente la fluorescencia para cada dosis o concentración. El valor máximo es la concentración más baja a la que la fluorescencia presenta una meseta o alcanza un máximo, que es cuando se produce la saturación. La mitad del valor máximo se considera una CE_{50} o un CI_{50} y se considera que el anticuerpo con la CE_{50}/CI_{50} más baja presenta la afinidad más alta con respecto a otros anticuerpos sometidos a prueba de la misma manera. Un ensayo de este tipo se describe en la presente memoria en el ejemplo 5.

En diversos aspectos, el valor de CI_{50} , tal como se determina en un ensayo de inhibición de la unión competitivo, presenta una aproximación de la K_D de la proteína de unión a antígeno. En diversos casos, tal como se expone a continuación, el ensayo de competición es un ensayo basado en FACS llevado a cabo con un anticuerpo de referencia, anticuerpo secundario conjugado con fluoróforo, y células que expresan CLDN6. En diversos aspectos, las células se modifican por ingeniería genética para sobreexpresar CLDN6. En algunos aspectos, las células son células HEK293T transducidas con un vector viral para expresar CLDN6. En aspectos alternativos, las células expresan CLDN6 de manera endógena. Antes de llevar a cabo el ensayo basado en FACS, en algunos aspectos, se determina previamente que las células que expresan CLDN6 de manera endógena son células con baja expresión de CLDN6 o células con alta expresión de CLDN6. En algunos aspectos, las células son células cancerosas o tumorales. En diversos aspectos, las células son células de una línea celular, por ejemplo, una línea celular de ovarios, línea celular endometrial, línea celular de vejiga, línea celular de pulmón, línea celular gastrointestinal (GI), línea celular de hígado, línea celular de pulmón y similares. En diversos aspectos, las células que expresan CLDN6 de manera endógena se seleccionan de entre el grupo que consiste en células de ovarios OVCA429, células endometriales ARK2, células de ovarios OAW28, células de vejiga UMUC-4, células de ovarios PEO14, células de ovarios OV177, células de pulmón H1693, células de tracto GI superior MKN7, células de ovarios OV-90, células de hígado HUH-7, células de ovarios JHOS-4, células de pulmón H1435 y células de tracto GI superior NUGC3. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno inhibe la interacción de unión entre CLDN6 humana expresada por las células y el anticuerpo de referencia, anticuerpo de referencia que es conocido que se une a CLDN6 pero no es una proteína de unión a antígeno de la presente divulgación. En diversos casos, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación compiten con el anticuerpo de referencia por la unión a CLDN6 humana y de ese modo reducen la cantidad de CLDN6 humana unida al anticuerpo de referencia tal como se determina mediante un ensayo de unión competitivo *in vitro*. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación inhiben la interacción de unión entre CLDN6 humana y el anticuerpo de referencia y la inhibición se caracteriza mediante una CI_{50} . En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno muestran una CI_{50} de menos de aproximadamente 2500 nM para inhibir la interacción de unión entre CLDN6 humana y el anticuerpo de referencia. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno muestran una CI_{50} de menos de aproximadamente 2000 nM, menos de aproximadamente 1500 nM, menos de aproximadamente 1000 nM, menos de aproximadamente 900 nM, menos de aproximadamente 800 nM, menos de aproximadamente 700 nM, menos de aproximadamente 600 nM, menos de aproximadamente 500 nM, menos de aproximadamente 400 nM, menos de aproximadamente 300 nM, menos de aproximadamente 200 nM o menos de aproximadamente 100 nM. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno muestran una CI_{50} de menos de aproximadamente 90 nM, menos de aproximadamente 80 nM, menos de aproximadamente 70 nM, menos de aproximadamente 60

nM, menos de aproximadamente 50 nM, menos de aproximadamente 40 nM, menos de aproximadamente 30 nM, menos de aproximadamente 20 nM o menos de aproximadamente 10 nM. En diversos casos, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación compiten contra un anticuerpo de referencia que es conocido que se une a CLDN6 (anticuerpo de referencia que es diferente de cualquiera de las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación) por la unión a CLDN6. Ver la descripción adicional en *Ensayos de competición*.

La avidéz proporciona una medida de la fuerza global de un complejo de anticuerpo-antígeno. Depende de tres parámetros principales: afinidad de la proteína de unión a antígeno por el epítipo, valencia tanto de la proteína de unión a antígeno como de CLDN6, y disposición estructural de las partes que interaccionan. Cuanto mayor es la valencia de una proteína de unión a antígeno (número de sitios de unión a antígeno), mayor es la cantidad de antígeno (CLDN6) a la que puede unirse. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno presentan una fuerte avidéz por CLDN6. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno son multivalentes. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno son bivalentes. En diversos casos, las proteínas de unión a antígeno son monovalentes.

Reactividad cruzada

En diversas puestas en práctica, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación se unen a CLDN6 y no se unen a ningún otro miembro de la familia de CLDN, por ejemplo, no reaccionan de manera cruzada con ningún otro miembro de la familia de CLDN. En diversos casos, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación son específicas de CLDN-6. En diversas puestas en práctica, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación presentan una selectividad por CLDN6 que es por lo menos 10 veces, 5 veces, 4 veces, 3 veces, 2 veces mayor que la selectividad de la proteína de unión a antígeno por CLDN3, CLDN4, CLDN9 o una combinación de las mismas. En diversas puestas en práctica, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación presentan una selectividad por CLDN6 que es por lo menos 10 veces, 5 veces, 4 veces, 3 veces, 2 veces mayor que la selectividad de la proteína de unión a antígeno por cada una de CLDN3, CLDN4 y CLDN9. La selectividad puede basarse en la K_D mostrada por la proteína de unión a antígeno para CLDN6, o un miembro de la familia de CLDN, en la que la K_D puede determinarse mediante técnicas conocidas en la materia, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial, ensayos de afinidad basados en FACS.

En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación se unen a CLDN6 y no se unen a ninguna de claudina 3 (CLDN3), claudina 4 (CLDN4) y claudina 9 (CLDN9). En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno no se unen a ninguna de CLDN3, CLDN4 y CLDN9 y muestran una Cl_{50} de menos de aproximadamente 1200 nM (por ejemplo, menos de aproximadamente 1000 nM, menos de aproximadamente 750 nM, menos de aproximadamente 500 nM, menos de aproximadamente 250 nM) en un ensayo basado en FACS con células OVCA429 que expresan CLDN6 de manera endógena. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno no se unen a ninguna de CLDN3, CLDN4 y CLDN9 y la concentración a la que se alcanza 50 % de la saturación de unión con células OVCA429 que expresan CLDN6 de manera endógena es de menos de aproximadamente 1200 nM (por ejemplo, menos de aproximadamente 1000 nM, menos de aproximadamente 750 nM, menos de aproximadamente 500 nM, menos de aproximadamente 250 nM). En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno muestran una selectividad por CLDN 6 por lo menos 5 veces mayor que por CLDN3, CLDN4 y CLDN9 y la concentración a la que se alcanza 50 % de la saturación de unión con células OVCA429 que expresan CLDN6 de manera endógena es de menos de aproximadamente 1200 nM (por ejemplo, menos de aproximadamente 1000 nM, menos de aproximadamente 750 nM, menos de aproximadamente 500 nM, menos de aproximadamente 250 nM). En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno muestran una Cl_{50} de menos de aproximadamente 1200 nM (por ejemplo, menos de aproximadamente 1000 nM, menos de aproximadamente 750 nM, menos de aproximadamente 500 nM, menos de aproximadamente 250 nM) por modelos endógenos y artificiales de CLDN6 y muestran una razón de más de aproximadamente 5 veces que separa las Cl_{50} para CLDN6 de las de CLDN3, CLDN4 y/o CLDN9. En diversos casos, las proteínas de unión a antígeno muestran una Cl_{50} de menos de aproximadamente 1200 nM (por ejemplo, menos de aproximadamente 1000 nM, menos de aproximadamente 750 nM, menos de aproximadamente 500 nM, menos de aproximadamente 250 nM) para CLDN6 y muestran una Cl_{50} para una cualquiera de CLDN3, CLDN4 y CLDN9 por lo menos 5 veces mayor que la Cl_{50} .

En diversas puestas en práctica, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación se unen a CLDN6 y reaccionan de manera cruzada con (por ejemplo, se unen a) por lo menos otro miembro de la familia de CLDN. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación se unen a CLDN6 y a una o más de CLDN3, CLDN4 y CLDN9. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación se unen a CLDN6 y CLDN4 o CLDN9, pero no se unen a CLDN3. En diversos casos, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación se unen a CLDN6 y CLDN4 pero no unen ni a CLDN3 ni a CLDN9. En diversos casos, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación se unen a CLDN6 y CLDN9 pero no se unen ni a CLDN3 ni a CLDN4.

Ensayos de competición

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno inhibe una interacción de unión entre CLDN6 humana y un anticuerpo de referencia, anticuerpo de referencia que es conocido que se une a CLDN6 pero no es una proteína de unión a antígeno de la presente divulgación. En diversos casos, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación compiten con el anticuerpo de referencia por la unión a CLDN6 humana y de ese modo reducen la cantidad de CLDN6 humana unida al anticuerpo de referencia tal como se determina mediante un ensayo de unión competitivo *in vitro*. En diversas puestas en práctica, el anticuerpo de referencia se une a un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CLDN6 humana, opcionalmente, dentro de EL2 o EL1. En diversos aspectos, el anticuerpo de referencia comprende una secuencia variable de cadena ligera codificada por SEC ID n°: 179, y una secuencia variable de cadena pesada codificada por SEC ID n°: 180. En diversos aspectos, el anticuerpo de referencia comprende una secuencia variable de cadena ligera de SEC ID n°: 181, y una secuencia variable de cadena pesada de SEC ID n°: 182. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación inhiben la interacción de unión entre CLDN6 humana y el anticuerpo de referencia y la inhibición se caracteriza mediante una Cl_{50} . En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno muestran una Cl_{50} de menos de aproximadamente 2500 nM para inhibir la interacción de unión entre CLDN6 humana y el anticuerpo de referencia. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno muestran una Cl_{50} de menos de aproximadamente 2000 nM, menos de aproximadamente 1500 nM, menos de aproximadamente 1000 nM, menos de aproximadamente 900 nM, menos de aproximadamente 800 nM, menos de aproximadamente 700 nM, menos de aproximadamente 600 nM, menos de aproximadamente 500 nM, menos de aproximadamente 400 nM, menos de aproximadamente 300 nM, menos de aproximadamente 200 nM o menos de aproximadamente 100 nM. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno muestran una Cl_{50} de menos de aproximadamente 90 nM, menos de aproximadamente 80 nM, menos de aproximadamente 70 nM, menos de aproximadamente 60 nM, menos de aproximadamente 50 nM, menos de aproximadamente 40 nM, menos de aproximadamente 30 nM, menos de aproximadamente 20 nM o menos de aproximadamente 10 nM.

En diversos casos, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación compiten con el anticuerpo de referencia por la unión a CLDN6 humana y de ese modo reducen la cantidad de CLDN6 humana unida al anticuerpo de referencia tal como se determina mediante un ensayo de unión competitivo *in vitro*. En diversos aspectos, el ensayo de unión competitivo *in vitro* es un ensayo basado en FACS en el que la fluorescencia de un anticuerpo secundario conjugado con fluoróforo que se une al Fc del anticuerpo de referencia se mide en ausencia o presencia de una cantidad particular de la proteína de unión a antígeno de la presente divulgación. Un ensayo basado en FACS de este tipo se describe en la presente memoria en los ejemplos. En diversos aspectos, el ensayo basado en FACS se lleva a cabo con el anticuerpo de referencia, anticuerpo secundario conjugado con fluoróforo y células que expresan CLDN6. En diversos aspectos, las células se modifican por ingeniería genética para sobreexpresar CLDN6. En algunos aspectos, las células son células HEK293T transducidas con un vector viral para expresar CLDN6. En aspectos alternativos, las células expresan CLDN6 de manera endógena. Antes de llevar a cabo el ensayo basado en FACS, en algunos aspectos, se determina previamente que las células que expresan CLDN6 de manera endógena son células con baja expresión de CLDN6 o células con alta expresión de CLDN6. En algunos aspectos, las células son células cancerosas o tumorales. En diversos aspectos, las células son células de una línea celular, por ejemplo, una línea celular de ovarios, línea celular endometrial, línea celular de vejiga, línea celular de pulmón, línea celular gastrointestinal (GI), línea celular de hígado, línea celular de pulmón y similares. En diversos aspectos, las células que expresan CLDN6 de manera endógena se seleccionan de entre el grupo que consiste en células de ovarios OVCA429, células endometriales ARK2, células de ovarios OAW28, células de vejiga UMUC-4, células de ovarios PEO14, células de ovarios OV177, células de pulmón H1693, células de tracto GI superior MKN7, células de ovarios OV-90, células de hígado HUH-7, células de ovarios JHOS-4, células de pulmón H1435 y células de tracto GI superior NUGC3. En diversos casos, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación se unen a CLDN6 expresada de manera endógena por una o más de células ARK2, células OVCA429, células LS513 o células MCF7 con alta afinidad. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno muestran una Cl_{50} de menos de aproximadamente 3000 nM tal como se determina en un ensayo de inhibición de la unión competitivo basado en FACS utilizando una o más de células ARK2, células OVCA429, células LS513 o células MCF7. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno muestran una Cl_{50} de menos de aproximadamente 2500 nM, menos de aproximadamente 2000 nM, menos de aproximadamente 1750 nM, menos de aproximadamente 1500 nM, menos de aproximadamente 1250 nM, menos de aproximadamente 1000 nM, menos de aproximadamente 750 nM o menos de aproximadamente 500 nM, tal como se determina en un ensayo de inhibición de la unión competitivo basado en FACS utilizando una o más de células ARK2, células OVCA429, células LS513 o células MCF7. En diversos aspectos, las proteínas de unión a antígeno muestran una Cl_{50} de menos de aproximadamente 400 nM, menos de aproximadamente 300 nM, menos de aproximadamente 200 nM, menos de aproximadamente 100 nM, menos de aproximadamente 75 nM, menos de aproximadamente 50 nM, menos de aproximadamente 25 nM o menos de aproximadamente 10 nM, tal como se determina en un ensayo de inhibición de la unión competitivo basado en FACS utilizando una o más de células ARK2, células OVCA429, células LS513 o células MCF7.

En la materia se conocen otros ensayos de unión, por ejemplo, ensayos de unión competitivos o ensayos de competición, que someten a prueba la capacidad de un anticuerpo para competir con un segundo anticuerpo por la unión a un antígeno, o a un epítipo del mismo. Ver, por ejemplo, Trikha *et al.*, Int J Cancer 110: 326-335 (2004);

Tam *et al.*, Circulation 98(11): 1085-1091 (1998), la publicación de solicitud de patente US nº US20140178905, Chand *et al.*, Biologicals 46: 168-171 (2017); Liu *et al.*, Anal Biochem 525: 89-91 (2017); y Goolia *et al.*, J Vet Diagn Invest 29(2): 250-253 (2017). Además, en la materia se conocen otros métodos de comparación de dos anticuerpos e incluyen, por ejemplo, resonancia de plasmón superficial (SPR). Puede utilizarse SPR para determinar las constantes de unión del anticuerpo y segundo anticuerpo y pueden compararse las dos constantes de unión.

Métodos de producción de anticuerpos y métodos relacionados

En la materia se conocen métodos adecuados de producción proteínas de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno y productos de proteína de anticuerpo). Por ejemplo, se describen métodos de hibridoma convencionales para producir anticuerpos, por ejemplo, en Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), y CA. Janeway *et al.* (eds.), Immunobiology, 5ª ed., Garland Publishing, Nueva York, NY (2001). En los ejemplos en la presente memoria se proporcionan diversos métodos de preparación de anticuerpos monoclonales frente a CLDN6 de la presente divulgación.

Dependiendo de la especie huésped, pueden utilizarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica conduciendo a una mayor producción de anticuerpos por el huésped. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, y sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles de tipo Pluronic, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de lapa californiana, y dinitrofenol. BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum* son potencialmente útiles como adyuvantes en seres humanos.

Otros métodos de producción de anticuerpos se resumen en la tabla 1.

Tabla 1

Técnica	Diversas referencias
Métodos de hibridoma de VEB y sistemas de expresión con vector de bacteriófago	Haskard y Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984), Roder <i>et al.</i> , Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986), y Huse <i>et al.</i> , Science, 246, 1275-81 (1989)).
Métodos de producción de anticuerpos en animales no humanos	Patentes Us nº 5.545.806, 5.569.825 y 5.714.352, y publicación de solicitud de patente US nº 2002/0197266
Inducción de producción <i>in vivo</i> en la población de linfocitos o mediante examen de bibliotecas de inmunoglobulina recombinante o paneles de reactivos de unión altamente específicos	Orlandi <i>et al</i> (Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837; 1989), y Winter G y Milstein C (Nature 349: 293-299, 1991).
Métodos de producción de proteínas recombinantes	"Protein production and purificación", Nat Methods 5(2): 135-146 (2008).
Presentación en fagos	Janeway <i>et al.</i> , citado anteriormente, Huse <i>et al.</i> , citado anteriormente, y patente US nº 6.265.150. Asimismo se describen métodos relacionados en la patente US nº 5.403.484; patente US nº 5.571.698; patente US nº 5.837.500; patente US nº 5.702.892. Las técnicas descritas en la patente US nº 5.780.279; patente US nº 5.821.047; patente US nº 5.824.520; patente US nº 5.855.885; patente US nº 5.858.657; patente US nº 5.871.907; patente US nº 5.969.108; patente US nº 6.057.098; y patente US nº 6.225.447
Pueden producirse anticuerpos mediante ratones transgénicos	Patentes US nº 5.545.806 y 5.569.825, y Janeway <i>et al.</i> , citado anteriormente.

En la materia se conocen métodos para someter a prueba anticuerpos para determinar su capacidad para unirse al epítipo de CLDN6 independientemente de cómo se producen los anticuerpos e incluyen cualquier ensayo de unión anticuerpo-antígeno, tal como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, inmunotransferencia western, inmunoprecipitación, SPR y ensayos de inhibición competitivos (ver, por ejemplo, Janeway *et al.*, citado a continuación, y publicación de solicitud de patente US nº 2002/0197266, y la sección anterior referente a ensayos de competición).

Secuencias / estructura

En la presente memoria se proporcionan proteínas de unión a antígeno que comprenden (a) una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de cadena pesada (HC) expuesta en la tabla A o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 11, 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125 y 131, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo

menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (b) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de HC expuesta en la tabla A o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID n°: 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 86, 102, 108, 114, 120, 126 y 132, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (c) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de HC expuesta en la tabla A o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID n°: 13, 19, 25, 31, 37, 43, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127 y 133, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (d) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera (LC) expuesta en la tabla A o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID n°: 8, 14, 20, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122 y 128, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (e) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de LC expuesta en la tabla A o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID n°: 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123 y 129, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (f) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de LC expuesta en la tabla A o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID n°: 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124 y 130, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; o (g) una combinación de dos o más cualesquiera de (a)-(f).

Tabla A

	CDR1 de LC	CDR2 de LC	CDR3 de LC	CDR1 de HC	CDR2 de HC	CDR3 de HC
AB1	8	9	10	11	12	13
AB2	14	15	16	17	18	19
AB3	20	21	22	23	24	25
AB4	26	27	28	29	30	31
AB5	32	33	34	35	36	37
AB6	38	39	40	41	42	43
AB7	44	45	46	47	48	49
AB8	50	51	52	53	54	55
AB9	56	57	58	59	60	61
AB10	62	63	64	65	66	67
AB11	68	69	70	71	72	73
AB12	74	75	76	77	78	79
AB13	80	81	82	83	84	85
AB14	86	87	88	89	90	91
AB15	92	93	94	95	96	97
AB16	98	99	100	101	102	103
AB17	104	105	106	107	108	109
AB18	110	111	112	113	114	115
AB19	116	117	118	119	120	121
AB20	122	123	124	125	126	127
AB21	128	129	130	131	132	133

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de LC, una secuencia de aminoácidos de CDR2 de LC y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de LC expuestas en la tabla A y por lo menos 1 o 2 de las secuencias de aminoácidos de CDR de HC expuestas en la tabla A. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de HC, una secuencia de aminoácidos de CDR2 de HC y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de HC expuestas en la tabla A y por lo menos 1 o 2 de las secuencias de aminoácidos de CDR de LC expuestas en la tabla A.

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende por lo menos 3, 4 o 5 de las secuencias de aminoácidos designadas mediante las SEC ID n°: en una única fila de la tabla A. En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende cada una de las secuencias de aminoácidos de CDR de LC

- designadas mediante las SEC ID nº: de una única fila de la tabla A y por lo menos 1 o 2 de las secuencias de aminoácidos de CDR de HC designadas mediante las SEC ID nº: de una única fila de la tabla A. En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende cada una de las secuencias de aminoácidos de CDR de HC designadas mediante las SEC ID nº: de una única fila de la tabla A y por lo menos 1 o 2 de las
- 5 secuencias de aminoácidos de CDR de LC designadas mediante las SEC ID nº: de una única fila de la tabla A. En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende las 6 de las secuencias de aminoácidos de CDR designadas mediante las SEC ID nº: de una única fila de la tabla A. En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende seis secuencias de aminoácidos de CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID nº: 74-79; (b) SEC ID nº: 50-55; (c) SEC ID nº: 122-127; (d) SEC ID nº: 26-31; (e) SEC
- 10 ID nº: 128-133; (f) SEC ID nº: 38-43; (g) SEC ID nº: 62-67; (h) SEC ID nº: 80-85; (i) SEC ID nº: 44-49; (j) SEC ID nº: 86-91; (k) SEC ID nº: 104-109; (l) SEC ID nº: 56-61; (m) SEC ID nº: 32-37; (n) SEC ID nº: 110-115; (o) SEC ID nº: 98-103; (p) SEC ID nº: 92-97; (q) SEC ID nº: 116-121; (r) SEC ID nº: 8-13; (s) SEC ID nº: 68-73; (t) SEC ID nº: 14-19; y (u) SEC ID nº: 20-25.
- 15 En diversos casos, las secuencias de aminoácidos de la tabla A están separadas mediante por lo menos uno o más (por ejemplo, por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) aminoácidos intermedios. En diversos casos, existen de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos entre las secuencias de la CDR1 de LC y la CDR2 de LC y de aproximadamente 25 a aproximadamente 40 aminoácidos entre las secuencias de la CDR2 de LC y la CDR3 de LC. En diversos casos, existen de aproximadamente 14 a aproximadamente 16 aminoácidos entre las
- 20 secuencias de la CDR1 de LC y la CDR2 de LC y de aproximadamente 30 a aproximadamente 35 aminoácidos entre las secuencias de CDR2 de LC y la CDR3 de LC. En diversos casos, existen de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos entre las secuencias de la CDR1 de HC y CDR2 de HC y de aproximadamente 25 a aproximadamente 40 aminoácidos entre las secuencias de la CDR2 de HC y la CDR3 de HC. En diversos casos, existen de aproximadamente 14 a aproximadamente 16 aminoácidos entre las secuencias de la CDR1 de
- 25 HC y CDR2 de HC y de aproximadamente 30 a aproximadamente 35 aminoácidos entre las secuencias de la CDR2 de HC y CDR3 de HC.
- En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada expuesta en la tabla B o una secuencia seleccionada de entre el grupo que
- 30 consiste en: SEC ID nº: 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173 y 175, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; o (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera expuesta en la tabla B o
- 35 una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174 y 176, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; o (c) tanto (a) como
- 40 (b).

Tabla B

	Región variable de cadena ligera	Región variable de cadena pesada
AB1	134	135
AB2	136	137
AB3	138	139
AB4	140	141
AB5	142	143
AB6	144	145
AB7	146	147
AB8	148	149
AB9	150	151
AB10	152	153
AB11	154	155
AB12	156	157
AB13	158	159
AB14	160	161
AB15	162	163
AB16	164	165
AB17	166	167
AB18	168	169
AB19	170	171
AB20	172	173
AB21	174	175

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende un par de secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID nº: 156 y 157; (b) SEC ID nº: 148 y 149; (c) SEC ID nº: 172 y 173; (d) SEC ID nº: 140 y 141; (e) SEC ID nº: 174 y 175; (f) SEC ID nº: 144 y 145; (g) SEC ID nº: 152 y 153; (h) SEC ID nº: 158 y 159; (i) SEC ID nº: 146 y 147; (j) SEC ID nº: 160 y 161; (k) SEC ID nº: 166 y 167; (l) SEC ID nº: 150 y 151; (m) SEC ID nº: 142 y 143; (n) SEC ID nº: 168 y 169; (o) SEC ID nº: 164 y 165; (p) SEC ID nº: 162 y 163; (q) SEC ID nº: 170 y 171; (r) SEC ID nº: 134 y 135; (s) SEC ID nº: 154 y 155; (t) SEC ID nº: 136 y 137; y (u) SEC ID nº: 138 y 139.

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno no comprende un par de secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de SEC ID nº: 179 y 180. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno no comprende un par de secuencias de aminoácidos de SEC ID nº: 181 y 182. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno no comprende un par de secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de SEC ID nº: 183 y 184. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno no comprende un par de secuencias de aminoácidos de SEC ID nº: 185 y 186.

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que es similar a una secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada, pero la proteína de unión a antígeno conserva sustancialmente su función biológica, por ejemplo, su capacidad para unirse a CLDN6 humana, reducir el crecimiento tumoral, tratar el cáncer.

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que difiere en únicamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más aminoácidos, con respecto a la(s) secuencia(s) de aminoácidos anteriormente mencionada(s). En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de variante de la secuencia mencionada, secuencia de variante difiere en únicamente uno o dos aminoácidos, con respecto a la secuencia mencionada. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una o más sustituciones de aminoácido que se producen fuera de las CDR, por ejemplo, la una o más sustituciones de aminoácido se producen dentro de la(s) región/regiones de entramado de la cadena pesada o ligera. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una o más sustituciones de aminoácido pero la proteína de unión a antígeno conserva las secuencias de aminoácidos de las seis CDR. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que únicamente presenta 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más sustituciones de aminoácido conservadoras, con respecto a la(s) secuencia(s) de aminoácidos anteriormente mencionada(s). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sustitución de aminoácido conservadora" se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que presenta propiedades similares, por ejemplo, tamaño, carga, hidrofobia, hidrofilia y/o aromaticidad, e incluye intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes:

I. Residuos pequeños alifáticos, no polares o ligeramente polares:

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Residuos polares, cargados negativamente y sus amidas y ésteres:

Asp, Asn, Glu, Gln, ácido cisteico y ácido homocisteico;

III. Residuos polares, cargados positivamente:

His, Arg, Lys; ornitina (Orn)

IV. Residuos grandes, alifáticos, no polares:

Met, Leu, Ile, Val, Cys, norleucina (Nle), homocisteína

V. Residuos grandes, aromáticos:

Phe, Tyr, Trp, acetil-fenilalanina

En diversos aspectos, la sustitución de aminoácido conservadora es un intercambio dentro de uno de los siguientes grupos de aminoácidos:

I. Aminoácidos alifáticos: Gly, Ala, Val, Leu, Ile

II. Aminoácidos no aromáticos que comprenden un hidroxilo en la cadena lateral: Ser, Thr

III. Aminoácidos que comprenden una cadena lateral con azufre: Cys, Met

IV. Aminoácidos que comprenden un anillo aromático en la cadena lateral: Phe, Tyr, Trp

V. Aminoácido ácido: Glu; Asp

VI. Aminoácido básico: Arg; Lys

VII. Aminoácido que comprende una amida en la cadena lateral: Gln, Asn

VIII. Aminoácido que comprende un imidazol en la cadena lateral: His, ácido alfa-dimetil-imidazol-acético (DMIA)

IX. Iminoácido: Pro, 4-hidroxi-Pro, 4-amino-Pro

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que presenta más de o aproximadamente 30 %, más de o aproximadamente 50 %, o más de o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 30 %, por lo menos 40 %, por lo menos 50 %, por lo menos 60 %, por lo menos 70 %, por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 % o presenta más de 90 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 70 %, por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 % o presenta más de 90 % de identidad de secuencia a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada.

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de variante de la secuencia mencionada, secuencia de variante que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia, con respecto a la secuencia anteriormente mencionada. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de variante de la secuencia mencionada, secuencia de variante que presenta por lo menos o aproximadamente 80 % de identidad de secuencia, con respecto a la secuencia anteriormente mencionada. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de variante de la secuencia mencionada, secuencia de variante que presenta por lo menos o aproximadamente 90 % de identidad de secuencia, con respecto a la secuencia anteriormente mencionada. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de variante de la secuencia mencionada, secuencia de variante que presenta por lo menos o aproximadamente 95 % de identidad de secuencia, con respecto a la secuencia anteriormente mencionada.

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende una, dos, tres, cuatro o cinco secuencias de las SEC ID n°: en una única fila de la tabla A y por lo menos una secuencia de variante que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de SEC ID n°: 8-133. En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende una, dos, tres, cuatro o cinco secuencias de un conjunto de secuencias seleccionadas de: (a) SEC ID n°: 74-79; (b) SEC ID n°: 50-55; (c) SEC ID n°: 122-127; (d) SEC ID n°: 26-31; (e) SEC ID n°: 128-133; (f) SEC ID n°: 38-43; (g) SEC ID n°: 62-67; (h) SEC ID n°: 80-85; (i) SEC ID n°: 44-49; (j) SEC ID n°: 86-91; (k) SEC ID n°: 104-109; (l) SEC ID n°: 56-61; (m) SEC ID n°: 32-37; (n) SEC ID n°: 110-115; (o) SEC ID n°: 98-103; (p) SEC ID n°: 92-97; (q) SEC ID n°: 116-121; (r) SEC ID n°: 8-13; (s) SEC ID n°: 68-73; (t) SEC ID n°: 14-19; y (u) SEC ID n°: 20-25, en la que la proteína de unión a antígeno comprende además por lo menos una secuencia de variante que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia con respecto a por lo menos una de las secuencias del conjunto. Por ejemplo, en diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende cuatro secuencias de SEC ID n°: 74-79, concretamente, SEC ID n°: 74-77, en la que la proteína de unión a antígeno comprende dos secuencias de variantes: una secuencia de variante que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia con respecto a SEC ID n°: 78 y otra secuencia de variante que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia con respecto a SEC ID n°: 79.

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende un par de secuencias de variantes que presentan por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de SEC ID n°: 134-175. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende un par de secuencias de variantes que presentan por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos

aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia con respecto a (a) SEC ID nº: 156 y 157; (b) SEC ID nº: 148 y 149; (c) SEC ID nº: 172 y 173; (d) SEC ID nº: 140 y 141; (e) SEC ID nº: 174 y 175; (f) SEC ID nº: 144 y 145; (g) SEC ID nº: 152 y 153; (h) SEC ID nº: 158 y 159; (i) SEC ID nº: 146 y 147; (j) SEC ID nº: 160 y 161; (k) SEC ID nº: 166 y 167; (l) SEC ID nº: 150 y 151; (m) SEC ID nº: 142 y 143; (n) SEC ID nº: 168 y 169; (o) SEC ID nº: 164 y 165; (p) SEC ID nº: 162 y 163; (q) SEC ID nº: 170 y 171; (r) SEC ID nº: 134 y 135; (s) SEC ID nº: 154 y 155; (t) SEC ID nº: 136 y 137; y (u) SEC ID nº: 138 y 139. En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende un par de secuencias: una secuencia de la tabla B y otra secuencia que es una secuencia de variante que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia con respecto a cualquiera de SEC ID nº: 134-175. En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende un par de secuencias: una secuencia seleccionada de (a) SEC ID nº: 156 y 157; (b) SEC ID nº: 148 y 149; (c) SEC ID nº: 172 y 173; (d) SEC ID nº: 140 y 141; (e) SEC ID nº: 174 y 175; (f) SEC ID nº: 144 y 145; (g) SEC ID nº: 152 y 153; (h) SEC ID nº: 158 y 159; (i) SEC ID nº: 146 y 147; (j) SEC ID nº: 160 y 161; (k) SEC ID nº: 166 y 167; (l) SEC ID nº: 150 y 151; (m) SEC ID nº: 142 y 143; (n) SEC ID nº: 168 y 169; (o) SEC ID nº: 164 y 165; (p) SEC ID nº: 162 y 163; (q) SEC ID nº: 170 y 171; (r) SEC ID nº: 134 y 135; (s) SEC ID nº: 154 y 155; (t) SEC ID nº: 136 y 137; y (u) SEC ID nº: 138 y 139, y otra secuencia que es una secuencia de variante que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia con respecto a una secuencia de (a) - (u). Por ejemplo, en diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende secuencias de SEC ID nº: 134 y la proteína de unión a antígeno comprende además una secuencia de variante que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia con respecto a SEC ID nº: 135.

En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada con una o más sustituciones de aminoácido para reducir o eliminar aminoácidos reactivos para reducir o prevenir reacciones de cadena lateral no deseadas. Por ejemplo, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada con uno o más (i) residuos de Trp sustituidos por His, Tyr, o Phe; (ii) residuos de Asn sustituidos por Gln, Ser, Ala, o Asp; (iii) residuos de Asp que se producen inmediatamente antes de un residuo de Pro sustituidos por Ala, Ser, o Glu; (iv) residuos de Asn sustituidos por Gln, Ser, o Ala; y/o (v) residuos de Cys sustituidos por Tyr, Ser, o Ala. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada con una sustitución de aminoácido que se predice que presenta una mayor afinidad de unión, mayor estabilidad u otro atributo positivo, basándose en acontecimientos de SHM o basándose en análisis estadísticos de una multitud de otras secuencias de anticuerpos similares. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende (a) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de HC expuesta en la tabla A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 452, 455, 461, 465, 71 y 472, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (b) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de HC expuesta en la tabla A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 475, 456, 462, 466, 468 y 473; o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (c) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de HC expuesta en la tabla A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 453, 457, 463, 467, 469 y 474; o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (d) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de LC expuesta en la tabla A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 449, 476, 458, 464, 68 y 470; o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (e) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de LC expuesta en la tabla A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 450, 477, 459, 57, 69 y 471; o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (f) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de LC expuesta en la tabla A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 451, 454, 460, 58, 70 y 112, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia o (g) una combinación de dos o más cualesquiera de (a)-(f).

Tabla A1

	CDR1 de LC	CDR2 de LC	CDR3 de LC	CDR1 de HC	CDR2 de HC	CDR3 de HC
AB1*	449	450	451	452	475	453
AB3*	476	477	454	455	456	457
AB4*	458	459	460	461	462	463
AB9*	464	57	58	465	466	467
AB11*	68	69	70	71	468	469
AB18*	470	471	112	472	473	474

En algunos aspectos, la CDR1 de HC comprende Gly inmediatamente en el extremo N-terminal de SEC ID nº: 452 y, opcionalmente, en algunos aspectos, la CDR1 de HC comprende MX inmediatamente en el extremo C-terminal de SEQ 452, en la que X es H, N o S. En diversos aspectos, la CDR3 de HC comprende Ala inmediatamente en el extremo N-terminal de SEC ID nº: 453. En diversos aspectos, la CDR1 de LC comprende además TAS inmediatamente en el extremo N-terminal de SEC ID nº: 449, y, opcionalmente, XH inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 449, en la que X es H, S, Y o Q. En algunos aspectos, tal como se describe a continuación, el primer aminoácido de SEC ID nº: 449 es S o Q. En algunos aspectos, tal como se describe a continuación, el primer aminoácido de SEC ID nº: 451 es S o Q.

En diversos aspectos, la CDR1 de HC comprende Gly inmediatamente en el extremo N-terminal de SEC ID nº: 455, y opcionalmente, en diversos aspectos, la CDR1 de HC comprende MX inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 455, en la que X es N, S o H. En algunos aspectos, CDR2 de HC comprende Gln inmediatamente en el extremo N-terminal de SEC ID nº: 456, y opcionalmente H inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 456. En diversos aspectos, la CDR1 de LC comprende RIS inmediatamente en el extremo N-terminal de SEC ID nº: 476, y opcionalmente, comprende LA inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 476. En diversos aspectos, la CDR2 de LC comprende XLVE inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 477, en la que X es I o S.

En diversos aspectos, la CDR1 de HC comprende MH inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 461. En diversos aspectos, la CDR2 de HC comprende Tyr inmediatamente en el extremo N-terminal de SEC ID nº: 462, y opcionalmente, TH inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 462. En aspectos ejemplificativos, la CDR3 de HC no incluye los dos primeros aminoácidos de SEC ID nº: 463. En diversos aspectos, la CDR1 de LC comprende RSS inmediatamente en el extremo N-terminal de SEC ID nº: 458, y opcionalmente, LN inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 458. En diversos aspectos, la CDR2 de LC comprende XRFS inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 459, en la que X es Q, S, A o D.

En diversos aspectos, la CDR1 de HC comprende MH inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 465. En diversos aspectos, la CDR2 de HC comprende YI inmediatamente en el extremo N-terminal de SEC ID nº: 466, y opcionalmente, Xaa inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 466, en la que Xaa es N, S, Q o A. En diversos aspectos, la CDR1 de LC comprende LAS inmediatamente en el extremo N-terminal de SEC ID nº: 464, y opcionalmente, LA inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 464. En diversos aspectos, la CDR2 de LC comprende SLAD inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 57.

En diversos aspectos, la CDR1 de HC comprende MH inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 71. En diversos aspectos, la CDR2 de HC comprende Tyr inmediatamente en el extremo N-terminal de SEC ID nº: 468 y opcionalmente IY inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 468. En diversos aspectos, la CDR1 de LC comprende RAS inmediatamente en el extremo N-terminal de SEC ID nº: 68, y opcionalmente SYIH inmediatamente en el extremo C-terminal con respecto a SEQ 68. En diversos aspectos, la CDR2 de LC comprende XLES inmediatamente en el extremo C-terminal con respecto a SEC ID nº: 69, en la que X es N, Q, S, A o D.

En diversos aspectos, la CDR1 de LC comprende KSS inmediatamente en el extremo N-terminal de SEC ID nº: 470, y opcionalmente YLA inmediatamente en el extremo C-terminal con respecto a SEQ 470. En diversos aspectos, la CDR2 de LC comprende TRES inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 471. En diversos aspectos, la CDR1 de HC comprende MN inmediatamente en el extremo C-terminal de SEC ID nº: 472. En diversos aspectos, la CDR2 de HC comprende Xaa inmediatamente en el extremo N-terminal de SEQ 473, en la que Xaa es N, Q, S o A, y opcionalmente, Thr inmediatamente en el extremo C-terminal de SEQ 473.

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de LC, una secuencia de aminoácidos de CDR2 de LC y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de LC expuestas en la tabla A1 y por lo menos 1 o 2 de las secuencias de aminoácidos de CDR de HC expuestas en la tabla A1. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de HC, una secuencia de aminoácidos de CDR2 de HC y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de HC expuestas en la tabla A1 y por lo menos 1 o 2 de las secuencias de aminoácidos de CDR de LC expuestas en la tabla A1.

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende por lo menos 3, 4 o 5 de las secuencias de aminoácidos designadas mediante las SEC ID n°: en una única fila de la tabla A1. En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende cada una de las secuencias de aminoácidos de CDR de LC designadas mediante las SEC ID n°: de una única fila de la tabla A1 y por lo menos 1 o 2 de las secuencias de aminoácidos de CDR de HC designadas mediante las SEC ID n°: de una única fila de la tabla A1. En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende cada una de las secuencias de aminoácidos de CDR de HC designadas mediante las SEC ID n°: de una única fila de la tabla A1 y por lo menos 1 o 2 de las secuencias de aminoácidos de CDR de LC designadas mediante las SEC ID n°: de una única fila de la tabla A1. En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende las 6 de las secuencias de aminoácidos de CDR designadas mediante las SEC ID n°: de una única fila de la tabla A1. En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende seis secuencias de aminoácidos de CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID n°: 449-453 y 475; (b) SEC ID n°: 476-477, 454-457; (c) SEC ID n°: 458-463; (d) SEC ID n°: 57, 58, 464-467; (e) SEC ID n°: 68-71 y 468-469; y (f) SEC ID n°: 112 y 470-474.

En diversos casos, las secuencias de aminoácidos de la tabla A1 están separadas mediante por lo menos uno o más (por ejemplo, por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) aminoácidos intermedios. En diversos casos, existen de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos entre las secuencias de la CDR1 de LC y la CDR2 de LC y de aproximadamente 25 a aproximadamente 40 aminoácidos entre las secuencias de la CDR2 de LC y la CDR3 de LC. En diversos casos, existen de aproximadamente 14 a aproximadamente 16 aminoácidos entre las secuencias de la CDR1 de LC y la CDR2 de LC y de aproximadamente 30 a aproximadamente 35 aminoácidos entre las secuencias de CDR2 de LC y la CDR3 de LC. En diversos casos, existen de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 aminoácidos entre las secuencias de la CDR1 de HC y CDR2 de HC y de aproximadamente 25 a aproximadamente 40 aminoácidos entre las secuencias de la CDR2 de HC y la CDR3 de HC. En diversos casos, existen de aproximadamente 14 a aproximadamente 16 aminoácidos entre las secuencias de la CDR1 de HC y CDR2 de HC y de aproximadamente 30 a aproximadamente 35 aminoácidos entre las secuencias de la CDR2 de HC y CDR3 de HC.

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada expuesta en la tabla B1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID n°: 478, 480, 482, 484, 486 y 488, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; o (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera expuesta en la tabla B1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID n°: 479, 481, 483, 485, 487 y 489, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; o (c) tanto (a) como (b).

Tabla B1

	Variable de HC	Variable de LC
AB1*	478	479
AB3*	480	481
AB4*	482	483
AB9*	488	489
AB11*	486	487
AB18*	484	485

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende un par de secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID n°: 478 y 479; (b) SEC ID n°: 480 y 481; (c) SEC ID n°: 482 y 483; (d) SEC ID n°: 484 y 485; (e) SEC ID n°: 486 y 487; y (f) SEC ID n°: 488 y 489. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de variante de una secuencia que presenta una SEC ID n°: indicada en la tabla B1 que difiere en únicamente uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia, en la que el/los diferente(s) aminoácido(s) se produce(n) en las posiciones descritas a continuación en "Anticuerpos humanizados".

Anticuerpos humanizados

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de una proteína de unión a antígeno descrita en la tabla A, tabla A1, tabla B o tabla B1.

AB1 humanizado

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB1 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35) sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena pesada en una o más de las siguientes posiciones: 5, 8, 11, 12, 13, 20, 31, 33, 35, 38, 40, 48, 50, 55, 57, 59, 61, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 74, 76, 79, 80, 82, 87, 90, 91, 98, 101 y 116. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 428. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB1 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena pesada en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12) de las siguientes posiciones: 20, 31, 35, 48, 50, 59, 67, 70, 74, 79, 98, 101. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 429. En diversos aspectos, los aminoácidos en las posiciones anteriormente mencionadas se seleccionan de los aminoácidos según la siguiente tabla:

Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos
5	Q, V	8	A, G	11	L, V
12	A, K	13	R, K	20	M, V
31	S, T, V, D	33	Y, T	35	H, N, S
38	K, R	40	R, A	48	I, M
50	F, V, T, Y, I	55	G, S	57	S, Y
59	D, E, N, S	61	N, A	65	K, Q
66	D, G	67	R, Q, N, K	68	T, V
70	L, M	72	R, A	74	K, T
		79	V, D, S, A	82	Q, E
87	T, R	91	S, T	98	N, Q, H, D, R
101	Y	76	ST	116	A, S

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB1 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena ligera en una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 o 41) de las siguientes posiciones: 1, 3, 4, 9, 10, 11, 15, 17, 21, 24, 27, 29, 32, 34, 35, 43, 44, 48, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 61, 67, 71, 72, 73, 79, 80, 81, 84, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 101, 107. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 430. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB1 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena ligera en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13) de las siguientes posiciones: 4, 21, 32, 34, 48, 51, 53, 61, 67, 79, 84, 91 y 93. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 431. En diversos aspectos, los aminoácidos en las posiciones anteriormente mencionadas se seleccionan de los aminoácidos según la siguiente tabla:

Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos
1	Q, D	3	V, Q	4	L, M
9	A, S	10	I, S	11	M, L
15	L, V	17	E, D	21	M, I
24	T, R	27	S, Q	32	T, V, F, D, S
34	F, L	35	H, S, Y, Q, N	43	S, K
44	S, A	48	W, L	51	S, T, Q, A
52	T, A	53	S, T, D, Q	54	N, S
		56	A, Q	61	R, Q, S, D,
67	A, S, T, G	71	S, D	72	Y, F
73	S, T	79	M, L	80	E, Q
81	A, P	84	A, F	90	H, Q
91	Q, H, S	93	H, Q, S, Y	94	R, S
97	L, P	101	A, Q	107	L, I
29	V, I	92	Y, S	95	S, T

AB3 humanizado

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB3 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena pesada en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 o 33) de las siguientes posiciones: 3, 5, 18, 19, 23, 31, 33, 35, 40, 42, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 61, 64, 76, 79, 80, 81, 87, 94, 95, 99, 106, 112, 114. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende

una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 432. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB3 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena pesada en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7) de las siguientes posiciones: 31, 35, 50, 55, 79, 99, 106. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 433. En diversos aspectos, los aminoácidos en las posiciones anteriormente mencionadas se seleccionan de los aminoácidos según la siguiente tabla:

Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos
3	K, Q	5	E, L	18	M, L
19	K, R	23	V, A	31	N, S, R
33	W, A	35	N, S, H	40	S, A
42	E, G	49	A, S	50	Q, S, N, H, A
		52	R, S	53	L, G
54	K, S	55	S, N, T, A, G	56	D, G
				59	A, S
61	H, Y	64	E, D	76	D, N
79	R, N, Q, D, S	80	S, T	81	V, L
87	N, S	94	G, A	95	T, V, I
99	N, D, T, K, A	106	C, Y, A, S, T	112	T, L
114	I, T				

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB3 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena ligera en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) de las siguientes posiciones: 9, 17, 18, 25, 27, 28, 30, 34, 40, 43, 45, 48, 50, 52, 53, 55, 56, 70, 72, 74, 76, 84, 85, 90, 91, 93, 94, 97 y 100. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 434. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB3 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena ligera en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9) de las siguientes posiciones: 25, 34, 48, 53, 55, 84, 85, 90 y 93. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 435. En diversos aspectos, los aminoácidos en las posiciones anteriormente mencionadas se seleccionan de los aminoácidos según la siguiente tabla:

Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos
9	A, S	17	E, D	18	T, R
25	I, V, L, T, A	34	A, S, N	40	Q, P
43	S, A	45	Q, K	48	V, I
53	I, V, L, T, S	55	V, T, L, A, Q	70	Q, D
72	S, T	74	K, T	76	N, S
84	G, A	85	N, Q, S, T	90	H, Q, S, T
93	T, S, N, G	100	G, Q	27	E, Q
28	N, S	30	Y, S	50	N, A
52	K, S	56	E, S	91	H, S
94	V, T	97	T, P		

AB4 humanizado

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB4 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena pesada en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 de las siguientes posiciones: 5, 11, 12, 13, 20, 29, 31, 33, 37, 38, 40, 45, 48, 50, 55, 56, 57, 59, 61, 62, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 74, 76, 79, 82, 84, 87, 91, 97, 101, 117. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 436. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB4 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena pesada en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19) de las siguientes posiciones: 20, 29, 31, 37, 45, 48, 56, 59, 61, 62, 65, 66, 68, 70, 74, 79, 84, 97 y 101. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 437. En diversos aspectos, los aminoácidos en las posiciones anteriormente mencionadas se seleccionan de los aminoácidos según la siguiente tabla:

Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos
5	Q, V	11	L, V	12	A, K
13	R, K	20	M, V	33	T, Y
37	I, V, F, Y	38	K, R	40	R, A

ES 3 017 207 T3

45	Q, L, V, T, N	48	I, M	50	Y, I
55	S, G	56	T, G, S, V, D	57	Y, S
59	H, K, S, Q, N	61	I, A, N, F, Y, V	62	K, Q
65	K, Q	66	D, G	67	K, R
68	A, V	70	L, M	72	A, R
74	T, K	76	S, T	79	A, V
82	Q, E	84	R, S, Q, D	87	T, R
91	S, T	97	S, A, T, V	101	L, V, F
117	A, S	29	F, Y, S, T	31	S, T, Y, D

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB4 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena ligera en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24) de las siguientes posiciones: 7, 14, 17, 18, 31, 33, 39, 41, 42, 44, 50, 51, 55, 57, 60, 81, 88, 92, 94, 95, 96, 99, 100, 105. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 438. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB4 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena ligera en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7) de las siguientes posiciones: 33, 39, 55, 57, 81, 95 y 96. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 439. En diversos aspectos, los aminoácidos en las posiciones anteriormente mencionadas se seleccionan de los aminoácidos según la siguiente tabla:

Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos
7	T, S	14	S, T	17	D, Q
18	Q, P	31	Y, H	33	D, N, E, Q
39	H, N, Q, D	41	F, Y	42	L, Q
44	K, R	50	K, R	51	R, L
55	K, R, Q	57	S, T, V	60	D, F
81	R, S, N, D	88	L, V	92	F, Y
94	M, S	95	Q, H, T	96	S, T, G, D
99	W, V	105	G, Q		

AB18 humanizado

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB 18 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena pesada en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25) de las siguientes posiciones: 5, 9, 11, 12, 20, 38, 40, 41, 43, 44, 48, 61, 65, 67, 68, 70, 72, 74, 76, 79, 82, 84, 87, 91 y 116, opcionalmente, una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) de las siguientes posiciones: 20, 48, 68, 70, 79. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 440 o 441. En diversos aspectos, los aminoácidos en las posiciones anteriormente mencionadas se seleccionan de los aminoácidos según la siguiente tabla:

Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos
5	K, V	9	P, A	11	L, V
12	E, K	20	I, V	38	K, R
40	S, A	41	N, P	43	K, Q
44	S, G	48	I, V, M	61	N, A
65	T, Q	67	K, R	68	A, V
70	L, M	72	V, R	74	K, T
76	S, T	79	A, V	82	Q, E
84	K, S	87	T, R	91	S, T
116	S, L				

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB 18 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena ligera en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16) de las siguientes posiciones: 1, 3, 9, 15, 18, 19, 21, 22, 49, 51, 69, 93, 84, 78, 105 y 111, opcionalmente, una o más (por ejemplo, 1, 2 o 3) de las siguientes posiciones: 19, 21 o 84. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 442 o 443. En diversos aspectos, los aminoácidos en las posiciones anteriormente mencionadas se seleccionan de los aminoácidos según la siguiente tabla:

Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos
1	N, D	3	M, V	9	S, D
15	A, L	18	K, R	19	V, A

ES 3 017 207 T3

21	M, I	22	S, N	49	S, P
51	R, K	69	T, S	83	N, S
84	V, L	89	L, V	105	A, Q
111	L, I				

AB9 humanizado

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB9 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena pesada en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29) de las siguientes posiciones: 1, 5, 9, 11, 12, 20, 38, 40, 41, 43, 44, 48, 61, 63, 65, 67, 69, 70, 72, 73, 74, 76, 79, 84, 87, 91, 93, 112 y 113. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 444. En diversos aspectos, los aminoácidos en las posiciones anteriormente mencionadas se seleccionan de los aminoácidos según la siguiente tabla:

<i>Posición</i>	<i>Aminoácidos</i>	<i>Posición</i>	<i>Aminoácidos</i>	<i>Posición</i>	<i>Aminoácidos</i>
1	E, Q	5	Q, V	9	P, A
11	L, V	12	V, K	20	M, V
38	K, R	40	S, A	41	H, P
43	K, Q	44	S, G	48	I, M
61	N, A	63	N, K	65	K, Q
67	K, R	69	A, V	70	L, M
72	V, R	73	N, D	74	K, T
76	S, T	79	A, V	84	R, S
87	T, R	91	S, T	93	A, V
112	T, L	113	L, V		

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB9 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena ligera en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15) de las siguientes posiciones: 9, 11, 15, 17, 18, 43, 45, 70, 72, 73, 74, 80, 84, 85 y 100. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 445. En diversos aspectos, los aminoácidos en las posiciones anteriormente mencionadas se seleccionan de los aminoácidos según la siguiente tabla:

<i>Posición</i>	<i>Aminoácidos</i>	<i>Posición</i>	<i>Aminoácidos</i>	<i>Posición</i>	<i>Aminoácidos</i>
9	A, S	11	Q, L	15	L, V
17	E, D	18	S, R	43	S, A
45	Q, K	70	R, D	72	S, T
73	F, L	74	K, R	80	A, P
84	V, A	85	S, T	100	G, Q

AB11 humanizado

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB11 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena pesada en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15) de las siguientes posiciones: 1, 15, 18, 19, 42, 49, 63, 75, 76, 78, 80, 84, 88 y 93. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 446. En diversos aspectos, los aminoácidos en las posiciones anteriormente mencionadas se seleccionan de los aminoácidos según la siguiente tabla:

<i>Posición</i>	<i>Aminoácidos</i>	<i>Posición</i>	<i>Aminoácidos</i>	<i>Posición</i>	<i>Aminoácidos</i>
1	D, E	15	R, G	18	R, L
19	K, R	42	E, G	49	A, S
63	T, S	75	P, A	76	T, K
78	T, S	80	F, Y	84	T, N
88	S, A	93	M, V		

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una versión humanizada de AB11 tal como se expone en la tabla B o B1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena ligera en una o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15) de las siguientes posiciones: 4, 9, 17, 22, 64, 78, 80, 81, 82, 83, 84, 87, 89, 104 y 110, opcionalmente, una o más de las siguientes posiciones: 4, 82, 110. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 447 o 448. En diversos aspectos, los aminoácidos en las posiciones anteriormente mencionadas se seleccionan de los aminoácidos según la siguiente tabla:

ES 3 017 207 T3

Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos	Posición	Aminoácidos
4	L, M	9	A, D	17	Q, E
22	S, N	64	A, D	78	N, T
80	H, S	81	P, S	82	V, L
83	E, Q	84	E, A	87	A, V
89	T, V	104	A, Q	110	L, I

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada expuesta en la tabla C o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: 376-379, 384-387, 391-396, 403-408, 412, 413, 416-419 y 422-427 o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %, o aproximadamente 85 %, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % de identidad de secuencia; o (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera expuesta en la tabla C o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: 380-383, 388-390, 397-402, 409-411, 414, 415, 420 y 421 o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %, o aproximadamente 85 %, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % de identidad de secuencia; o (c) tanto (a) como (b).

Tabla C

	Región variable de cadena ligera humanizada	Región variable de cadena pesada humanizada
AB1	380, 381, 382, 383	376, 377, 378, 379
AB3	388, 389, 390	384, 385, 386, 387, 422
AB4	397, 398, 399, 400, 401, 402	391, 392, 392, 394, 395, 396, 423, 424, 425, 426, 427
AB9	409, 410, 411,	403, 404, 405, 406, 407, 408
AB11	414, 415	412, 413
AB18	420, 421	416, 417, 418, 419

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno humanizada comprende un par de secuencias de aminoácidos tal como se muestran en la tabla D.

Tabla D

AB humanizado	HC	LC
1-1	376	380
1-2	377	380
1-3	377	381
1-4	377	382
1-5	377	383
1-6	378	381
1-7	378	382
1-8	378	383
1-9	379	381
1-10	379	382
1-11	379	383
3-1	384	388
3-2	385	388
3-3	385	389
3-4	386	388
3-5	386	389
3-6	387	388
3-7	387	389
3-9	422	389
4-1	391	397
4-2	392	397
4-3	392	398
4-4	393	398
4-5	394	398
4-6	395	398
4-7	396	398
4-8	423	398

4-9	424	398
4-10	425	398
4-11	426	398
4-12	427	398
9-1	403	409
9-2	404	409
9-3	405	410
9-4	405	411
9-5	406	410
9-6	406	411
9-7	407	410
9-8	407	411
9-9	408	410
9-10	408	411
11-1	412	414
11-2	413	414
11-3	413	415
18-1	416	420
18-2	417	420
18-3	417	420
18-4	417	421
18-5	418	420
18-6	418	421
18-7	419	420
18-8	419	421

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende un par de secuencias de variantes, que presentan, cada una, por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia con respecto a una SEC ID n°: indicada en la tabla C. En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende un par de secuencias: una secuencia seleccionada de una SEC ID n°: indicada en la tabla C y otra secuencia que es una secuencia de variante que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia con respecto a una secuencia que presenta una SEC ID n°: indicada en la tabla D una secuencia que presenta una SEC ID n°: indicada en la tabla C.

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende un par de secuencias: una secuencia seleccionada de una SEC ID n°: indicada en la tabla D, y otra secuencia que es una secuencia de variante que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia con respecto a una secuencia que presenta una SEC ID n°: indicada en la tabla D. Por ejemplo, en diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de SEC ID n°: 419 y la proteína de unión a antígeno comprende además una secuencia de variante que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos aproximadamente 85 %, por lo menos aproximadamente 90 %, por lo menos aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia con respecto a SEC ID n°: 421.

En diversos casos, la proteína de unión a antígeno es una proteína de unión a antígeno humanizada tal como se expone en la tabla D con una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35) sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena pesada (HC) o en la región variable de cadena ligera (LC), o en ambas. En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno es una proteína de unión a antígeno humanizada de AB1-11 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de HC, la región variable de LC, o ambas. En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende una HC de SEC ID n°: 379 con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácido. En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende una CDR1 de HC de SEC ID n°: 504, una CDR2 de HC de SEC ID n°: 505, una CDR3 de HC de SEC ID n°: 506, o una combinación de las mismas. En casos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende una HC de SEC ID n°: 503. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una HC de una cualquiera de SEC ID n°: 496-501. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de HC etiquetada como S7-S12 en la figura 22. En diversos casos, la región variable de cadena ligera comprende una CDR1 de LC de SEC ID n°: 449, una CDR2 de LC de SEC ID n°: 450, una CDR3 de LC de SEC ID n°: 451, o una combinación de las mismas. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una LC de una cualquiera de SEC ID n°: 380-383 y 479. En casos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende una LC de SEC ID n°: 383. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de LC etiquetada como

S7-S12 en la figura 22. En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno es una proteína de unión a antígeno humanizada de AB3-7 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de HC, la región variable de LC, o ambas. En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende una HC de SEC ID nº: 387 con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácido. En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende una CDR1 de HC de SEC ID nº: 507, una CDR2 de HC de SEC ID nº: 508, una CDR3 de HC de SEC ID nº: 509, o una combinación de las mismas. En casos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende una HC de SEC ID nº: 502. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una HC de una cualquiera de SEC ID nº: 490-495. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de HC etiquetada como S1-S6 en la figura 22. En diversos casos, la región variable de cadena ligera comprende una CDR1 de LC de SEC ID nº: 476, una CDR2 de LC de SEC ID nº: 477, una CDR3 de LC de SEC ID nº: 454, o una combinación de las mismas. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una LC de una cualquiera de SEC ID nº: 388-390 y 481. En casos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende una LC de SEC ID nº: 389. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de LC etiquetada como S1-S6 en la figura 22. En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno es una proteína de unión a antígeno humanizada de AB3 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de HC, la región variable de LC, o ambas. En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende una HC de SEC ID nº: 139 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una HC de una cualquiera de SEC ID nº: 510. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de HC de SEC ID nº: 510 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido tal como se muestra en la figura 23. En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende una HC de SEC ID nº: 138 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una HC de una cualquiera de SEC ID nº: 511. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de HC de SEC ID nº: 511 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido tal como se muestra en la figura 24. En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno es una proteína de unión a antígeno humanizada de AB1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de HC, la región variable de LC, o ambas. En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende una HC de SEC ID nº: 135 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una HC de una cualquiera de SEC ID nº: 513. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de HC de SEC ID nº: 513 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido tal como se muestra en la figura 25. En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende una HC de SEC ID nº: 134 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una HC de una cualquiera de SEC ID nº: 512. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de HC de SEC ID nº: 512 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido tal como se muestra en la figura 26.

Anticuerpos afucosilados

Muchas proteínas secretadas experimentan glucosilación postraduccional, un proceso mediante el cual se unen restos de azúcar (por ejemplo, glicanos, sacáridos) de manera covalente a aminoácidos específicos de una proteína. En células eucariotas, se producen dos tipos de reacciones de glucosilación: (1) glucosilación unida en N, en la que se unen glicanos a la asparagina de la secuencia de reconocimiento Asn-X-Thr/Ser, en la que "X" es cualquier aminoácido excepto prolina, y (2) glucosilación unida en O en la que se unen glicanos a serina o treonina. Independientemente del tipo de glucosilación (unida en N o unida en O), existe microheterogeneidad de glicoformas de proteína debido a la gran gama de estructuras de glicano asociadas con cada sitio (O o N).

Todos los N-glicanos presentan una secuencia de azúcar central común: Man α 1-6(Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-Asn-X-Ser/Thr (Man $_3$ GlcNAc $_2$ Asn) y se clasifican en uno de tres tipos: (A) un tipo de alto contenido en manosa (HM) u oligomanosa (OM), que consiste en dos restos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y un gran número (por ejemplo, 5, 6, 7, 8 o 9) de residuos de manosa (Man), (B) un tipo complejo, que comprende más de dos restos de GlcNAc y cualquier número de otros tipos de azúcar, o (C) un tipo híbrido, que comprende un residuo de Man en un lado de la rama y GlcNAc en la base de una rama compleja. La figura 1A (tomada de Stanley *et al.*, Chapter 8: N-Glycans, Essentials of Glycobiology, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009) muestra los tres tipos de N-glicanos.

Los glicanos unidos en N comprenden normalmente uno o más monosacáridos de galactosa (Gal), N-acetilgalactosamina (GalNAc), galactosamina (GalN), glucosa (GLc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), glucosamina (GlcN), manosa (Man), N-acetilmanosamina (ManNAc), manosamina (ManN), xilosa (Xil), ácido N0-acetilneuramínico (Neu5Ac), ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), ácido 2-ceto-3-doxinonónico (Kdn), fucosa (Fuc), ácido glucurónico (GLcA), ácido idurónico (IdoA), ácido galacturónico (Gal A), ácido manurónico (Man A). Los símbolos habitualmente utilizados para tales sacáridos se muestran en la figura 29A.

La glucosilación unida en N comienza en el retículo endoplasmático (ER), en el que un conjunto complejo de reacciones da como resultado la unión de una estructura de glicano central compuesta esencialmente por dos residuos de GlcNAc y tres residuos de Man. El complejo de glicano formado en el ER se modifica mediante acción de enzimas en el aparato de Golgi. Si el sacárido es relativamente inaccesible para las enzimas, normalmente

permanece en la forma HM original. Si las enzimas pueden acceder al sacárido, entonces muchos de los residuos de Man se escinden y el sacárido se modifica adicionalmente, dando como resultado la estructura de N-glicanos de tipo complejo. Por ejemplo, la manosidasa-1, ubicada en la región cis de Golgi, puede escindir o hidrolizar un glicano HM, mientras que la fucosiltransferasa FUT-8, ubicada en la región medial de Golgi, fucosila el glicano (Hanrue Imai-Nishiya (2007), BMC Biotechnology, 7:84).

Por lo tanto, la composición de azúcar y la configuración estructural de una estructura de glicano varía dependiendo de la maquinaria de glucosilación en el ER y el aparato de Golgi, la accesibilidad de las enzimas de la maquinaria a la estructura de glicano, el orden de acción de cada enzima y la fase en la que se libera la proteína a partir de la maquinaria de glucosilación, entre otros factores.

En puestas en práctica ejemplificativas de la presente divulgación, las proteínas de unión a antígeno comprenden un polipéptido de Fc. El término "polipéptido de Fc" tal como se utiliza en la presente memoria incluye formas naturales y de muteína de polipéptidos derivados de la región Fc de un anticuerpo. En aspectos ejemplificativos, el polipéptido de Fc de la proteína de unión a antígeno divulgada en la presente memoria comprende un glicano. En diversos casos, el glicano carece de fucosa o está afucosilado. En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende un glicano afucosilado. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "glicano afucosilado" o "afuco-glicano" o "glicoforma afucosilada" o "Afuc" se refiere a glicoformas que carecen de una fucosa central, por ejemplo, una fucosa unida en α 1,6 en el residuo de GlcNAc implicado en el enlace amida con el Asn del sitio de N-glucosilación. Las glicoformas afucosiladas incluyen, pero no se limitan a, A1G0, A2G0, A2G1a, A2G1b, A2G2 y A1G1M5. Los glicanos afucosilados adicionales incluyen, por ejemplo, A1G1a, G0[H3N4], G0[H4N4], G0[H5N4], FO-N[H3N3]. Ver, por ejemplo, Reusch y Tejada, Glycobiology 25(12): 1325-1334 (2015).

La presente divulgación asimismo proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que comprende una proteína de unión a antígeno que comprende un polipéptido de Fc que comprende un glicano afucosilado. En aspectos ejemplificativos, por lo menos o aproximadamente el 25 % de las proteínas de unión a antígeno presentes en la composición son proteínas de unión a antígeno que comprenden un polipéptido de Fc que comprende un glicano afucosilado. En aspectos ejemplificativos, por lo menos o aproximadamente 25 % de las proteínas de unión a antígeno presentes en la composición están afucosiladas. Opcionalmente, por lo menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % o más de las proteínas de unión a antígeno presentes en la composición están afucosiladas. En la materia se conocen métodos de producción de composiciones que comprenden proteínas de unión a antígeno de un glicoperfil particular. En puestas en práctica ejemplificativas, las proteínas de unión a antígeno se producen de manera recombinante en células que están genéticamente modificadas para alterar la actividad de una enzima de la ruta *de novo* o la ruta de rescate. Estas dos rutas de metabolismo de fucosa se muestran en la figura 29B. En puestas en práctica ejemplificativas, las células están genéticamente modificadas para alterar la actividad de uno cualquiera o más de: una fucosil-transferasa (FUT, por ejemplo, FUT1, FUT2, FUT3, FUT4, FUT5, FUT6, FUT7, FUT8, FUT9), una fucosa cinasa, una GDP-fucosa pirofosforilasa, GDP-D-manosa-4,6-deshidratasa (GMD) y GDP-ceto-6-desoximanosa-3,5-epimerasa, 4-reductasa (FX). En puestas en práctica ejemplificativas, las células están modificadas genéticamente para desactivar un gen que codifica FX. Ver, por ejemplo, la publicación de patente internacional nº WO2017/079165 A1; Kanda *et al.*, J Biotechnol 130, 2007, 300-310, Yamane-Ohunuki *et al.*, Biotechnol Bioeng 87, 2004, 614-622, Malphettes *et al.*, Biotechnol Bioeng 106, 2010, 774-783.

Ácidos nucleicos

La presente divulgación proporciona además ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno de la presente divulgación. "Ácido nucleico", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico", y significa de manera general un polímero de ADN o ARN, o formas modificadas de los mismos, que puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, sintetizado u obtenido (por ejemplo, aislado y/o purificado) a partir de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que puede contener una unión entre nucleótidos natural, no natural o alterada, tal como una unión fosforoamidato o una unión fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación. En diversos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno que comprende (a) una secuencia de aminoácidos de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de cadena pesada (HC) expuesta en la tabla A o A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 11, 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 452, 455, 461, 465 y 472, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 80 %, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %, por lo menos o aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (b) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de HC expuesta en la tabla A o A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 475, 456, 462, 466, 468 y 473; o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 80 %, por lo menos o

aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %, por lo menos o aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (c) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de HC expuesta en la tabla A o A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 13, 19, 25, 31, 37, 43, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 453, 457, 463, 467, 469 y 474; o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 80 %, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %, por lo menos o aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (d) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera (LC) expuesta en la tabla A o A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 8, 14, 20, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 449, 476, 458, 464 y 470; o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 80 %, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %, por lo menos o aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (e) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de LC expuesta en la tabla A o A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 450, 477, 459 y 471; o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 80 %, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %, por lo menos o aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; (f) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de LC expuesta en la tabla A o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 451, 454 y 460, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 80 %, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %, por lo menos o aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; o (g) una combinación de dos o más cualesquiera de (a)-(f). En diversos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de LC, una secuencia de aminoácidos de CDR2 de LC y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de LC expuestas en la tabla A o A1 y por lo menos 1 o 2 de las secuencias de aminoácidos de CDR de HC expuestas en la tabla A o A1. En diversos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno que comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de HC, una secuencia de aminoácidos de CDR2 de HC y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de HC expuestas en la tabla A o A1 y por lo menos 1 o 2 de las secuencias de aminoácidos de CDR de LC expuestas en la tabla A o A1. En diversas puestas en práctica, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno que comprende (a) por lo menos 3, 4 o 5 de las secuencias de aminoácidos designadas mediante las SEC ID nº: en una única fila de la tabla A o A1, (b) cada una de las secuencias de aminoácidos de CDR de LC designadas mediante las SEC ID nº: de una única fila de la tabla A o A1 y por lo menos 1 o 2 de las secuencias de aminoácidos de CDR de HC designadas mediante las SEC ID nº: de una única fila de la tabla A o A1, (c) cada una de las secuencias de aminoácidos de CDR de HC designadas mediante las SEC ID nº: de una única fila de la tabla A o A1 y por lo menos 1 o 2 de las secuencias de aminoácidos de CDR de LC designadas mediante las SEC ID nº: de una única fila de la tabla A o A1, (d) las 6 de las secuencias de aminoácidos de CDR designadas mediante las SEC ID nº: de una única fila de la tabla A, y/o (e) seis secuencias de aminoácidos de CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID nº: 74-79; (b) SEC ID nº: 50-55; (c) SEC ID nº: 122-127; (d) SEC ID nº: 26-31; (e) SEC ID nº: 128-133; (f) SEC ID nº: 38-43; (g) SEC ID nº: 62-67; (h) SEC ID nº: 80-85; (i) SEC ID nº: 44-49; (j) SEC ID nº: 86-91; (k) SEC ID nº: 104-109; (l) SEC ID nº: 56-61; (m) SEC ID nº: 32-37; (n) SEC ID nº: 110-115; (o) SEC ID nº: 98-103; (p) SEC ID nº: 92-97; (q) SEC ID nº: 116-121; (r) SEC ID nº: 8-13; (s) SEC ID nº: 68-73; (t) SEC ID nº: 14-19; (u) SEC ID nº: 20-25, (v) SEC ID nº: 449-453 y 475; (w) SEC ID nº: 476-477, 454-457; (x) SEC ID nº: 458-463; (y) SEC ID nº: 57, 58, 464-467; (z) SEC ID nº: 68-71 y 468-469; y (aa) SEC ID nº: 112 y 470-474. En diversas puestas en práctica, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno que comprende (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada expuesta en la tabla B o B1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 478, 480, 482, 484, 486 y 488, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 80 %, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %, por lo menos o aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; o (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera expuesta en la tabla B o B1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 479, 481, 483, 485, 487 y 489 o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 80 %, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %, por lo menos o aproximadamente 95 %) de identidad de secuencia; o (c) tanto (a) como (b). En diversas puestas en práctica, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno que comprende un par de secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID nº: 156 y 157; (b) SEC ID nº: 148 y 149; (c) SEC ID nº: 172 y 173; (d) SEC ID nº: 140 y 141; (e) SEC ID nº: 174 y 175; (f) SEC ID nº: 144 y 145; (g) SEC ID nº: 152 y 153; (h) SEC ID nº: 158 y 159; (i) SEC ID nº: 146 y 147; (j) SEC ID nº: 160 y 161; (k) SEC ID nº: 166 y 167; (l) SEC ID nº: 150 y 151; (m) SEC ID nº: 142 y 143; (n) SEC ID nº: 168 y 169; (o) SEC ID nº: 164 y 165; (p) SEC ID nº: 162 y 163; (q) SEC ID nº: 170

y 171; (r) SEC ID nº: 134 y 135; (s) SEC ID nº: 154 y 155; (t) SEC ID nº: 136 y 137; y (u) SEC ID nº: 138 y 139. En diversas puestas en práctica, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno que comprende un par de secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en los pares indicados en la tabla D. En diversos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia de una cualquiera o más de SEC ID nº: 208-375. En algunas puestas en práctica, el ácido nucleico no comprende ninguna inserción, delección, inversión y/o sustitución. En otras puestas en práctica, el ácido nucleico comprende una o más inserciones, delecciones, inversiones y/o sustituciones.

En diversos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que es una proteína de unión a antígeno humanizada tal como se expone en la tabla D con una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35) sustituciones de aminoácido en la región variable de cadena pesada (HC) o en la región variable de cadena ligera (LC), o en ambas. En aspectos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que es una proteína de unión a antígeno humanizada de AB1-11 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de HC, la región variable de LC, o ambas. En aspectos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC de SEC ID nº: 379 con 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones de aminoácido. En aspectos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una CDR1 de HC de SEC ID nº: 504, una CDR2 de HC de SEC ID nº: 505, una CDR3 de HC de SEC ID nº: 506, o una combinación de las mismas. En casos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC de SEC ID nº: 503. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC de una cualquiera de SEC ID nº: 496-501. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC etiquetada como S7-S12 en la figura 22. En diversos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 de LC de SEC ID nº: 449, una CDR2 de LC de SEC ID nº: 450, una CDR3 de LC de SEC ID nº: 451, o una combinación de las mismas. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una LC de una cualquiera de SEC ID nº: 380-383 y 479. En casos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una LC de SEC ID nº: 383. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una LC etiquetada como S7-S12 en la figura 22. En aspectos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que es una proteína de unión a antígeno humanizada de AB3-7 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de HC, la región variable de LC, o ambas. En aspectos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC de SEC ID nº: 387 con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácido. En aspectos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una CDR1 de HC de SEC ID nº: 507, una CDR2 de HC de SEC ID nº: 508, una CDR3 de HC de SEC ID nº: 509, o una combinación de las mismas. En casos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC de SEC ID nº: 502. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC de una cualquiera de SEC ID nº: 490-495. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC etiquetada como S1-S6 en la figura 22. En diversos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera que comprende una CDR1 de LC de SEC ID nº: 476, una CDR2 de LC de SEC ID nº: 477, una CDR3 de LC de SEC ID nº: 454, o una combinación de las mismas. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una LC de una cualquiera de SEC ID nº: 388-390 y 481. En casos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una LC de SEC ID nº: 389. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una LC etiquetada como S1-S6 en la figura 22.

En aspectos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que es una proteína de unión a antígeno humanizada de AB3 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de HC, la región variable de LC, o ambas. En aspectos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC de SEC ID nº: 139 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC de una cualquiera de SEC ID nº: 510. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC de SEC ID nº: 510 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido tal como se muestra en la figura 23. En aspectos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC de SEC ID nº: 138 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a

antígeno que comprende una HC de una cualquiera de SEC ID nº: 511. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una secuencia de HC de SEC ID nº: 511 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido tal como se muestra en la figura 24. En aspectos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que es una proteína de unión a antígeno humanizada de AB1 con una o más sustituciones de aminoácido en la región variable de HC, la región variable de LC, o ambas. En aspectos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC de SEC ID nº: 135 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC de una cualquiera de SEC ID nº: 513. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una secuencia de HC de SEC ID nº: 513 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido tal como se muestra en la figura 25. En aspectos ejemplificativos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC de SEC ID nº: 134 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una HC de una cualquiera de SEC ID nº: 512. En algunos aspectos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno que comprende una secuencia de HC de SEC ID nº: 512 con 1, 2, 3, 4 o 5 (o más) sustituciones de aminoácido tal como se muestra en la figura 26. En algunas puestas en práctica, el ácido nucleico no comprende ninguna inserción, delección, inversión y/o sustitución. En otras puestas en práctica, el ácido nucleico comprende una o más inserciones, delecciones, inversiones y/o sustituciones.

En algunos aspectos, los ácidos nucleicos de la presente divulgación son recombinantes. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "recombinante" se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de células vivas mediante unión de segmentos de ácidos nucleicos naturales o sintéticos a moléculas de ácido nucleico que pueden replicarse en una célula viva, o (ii) moléculas que resultan de la replicación de las descritas en el punto (i) anterior. En el contexto de la presente memoria, la replicación puede ser replicación *in vitro* o replicación *in vivo*.

Los ácidos nucleicos en algunos aspectos se construyen basándose en síntesis química y/o reacciones de ligación enzimática utilizando procedimientos conocidos en la materia. Ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente; y Ausubel *et al.*, citado anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico puede sintetizarse químicamente utilizando nucleótidos que se producen de manera natural o nucleótidos modificados de diversas maneras diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que pueden utilizarse para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina sustituida en N, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-5-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, uno o más de los ácidos nucleicos de la presente divulgación pueden adquirirse de empresas tales como Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) y Synthegen (Houston, TX).

Vector

En algunos aspectos, los ácidos nucleicos de la presente divulgación se incorporan en un vector. Con respecto a esto, la presente divulgación proporciona vectores que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos divulgados en la presente memoria. En diversos aspectos, el vector es un vector de expresión recombinante. Para los fines de la presente memoria, el término "vector de expresión recombinante" significa un constructo de oligonucleótido o polinucleótido genéticamente modificado que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido por una célula huésped, cuando el constructo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm, la proteína, el polipéptido o el péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para hacer que el ARNm, la proteína, el polipéptido o el péptido se exprese dentro de la célula. Los vectores de la presente divulgación no se producen de manera natural en su conjunto. Sin embargo, partes de los vectores pueden producirse de manera natural. Los vectores divulgados en la presente memoria pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, incluyendo, pero sin limitarse a, ADN y ARN, que pueden ser de cadena sencilla o de cadena doble, sintetizarse u obtenerse en parte a partir de fuentes naturales, y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores pueden comprender uniones internucleotídicas que se producen de manera natural o que no se producen de manera natural, o ambos tipos de uniones. En algunos aspectos, los nucleótidos alterados o uniones internucleotídicas que no se producen de manera natural no dificultan la transcripción o replicación del vector.

El vector de la presente divulgación puede ser cualquier vector adecuado, y puede utilizarse para transducir,

transformar o transfectar cualquier huésped adecuado. Los vectores adecuados incluyen los diseñados para la propagación y expansión o para la expresión o ambas, tales como plásmidos y virus. El vector puede ser un vector de expresión basado en plásmido. En diversos aspectos, el vector se selecciona de entre el grupo que consiste en la serie pUC (Fermentas Life Sciences), la serie pBluescript (Stratagene, LaJolla, CA), la serie pET (Novagen, Madison, WI), la serie pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y la serie pEX (Clontech, Palo Alto, CA). Asimismo pueden utilizarse vectores de bacteriófagos, tales como λ GT10, λ GT11, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4 y λ NMI 149. Los ejemplos de vectores de expresión de plantas incluyen pBIOI, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Los ejemplos de vectores de expresión de animales incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). En algunos aspectos, el vector es un vector viral, por ejemplo, un vector retroviral. En diversos aspectos, el vector es un vector de adenovirus, un vector de virus adenoasociado (AAV), un vector de virus del herpes simple (VHS), un vector de virus de la estomatitis vesicular (VEV), vector de virus vaccinia o vector de lentivirus. Ver, por ejemplo, Howarth *et al.*, Cell Biol. Toxicol. 26(1): 1-20 (2010). En diversos aspectos, el vector es un vector de baculovirus que infecta a artrópodos, por ejemplo, insectos. En diversos aspectos, el vector de baculovirus es un vector de virus nuclear múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) o un vector de poliedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV). Ver, por ejemplo, Khan, Adv Pharm Bull 3(2): 257-263 (2013); Miller, Bioessays 11(4): 91-96 (1989); Atkinson *et al.*, Pestic Sci 28: 215-224 (1990).

Los vectores de la presente divulgación pueden prepararse utilizando técnicas de ADN recombinante convencionales descritas, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, citado anteriormente, y Ausubel *et al.*, citado anteriormente. Pueden prepararse constructos de vectores de expresión, que son circulares o lineales, para contener un sistema de replicación funcional en una célula huésped procariota o eucariota. Pueden derivarse sistemas de replicación, por ejemplo, de ColEI, plásmido 2 μ , λ , SV40, virus de papiloma bovina y similares.

En algunos aspectos, el vector comprende secuencias reguladoras, tales como codones de inicio y terminación de la transcripción y la traducción, que son específicos para el tipo de huésped (por ejemplo, bacteria, hongo, planta o animal) en el que va a introducirse el vector, según sea apropiado y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o ARN.

El vector puede incluir uno o más genes de marcadores, que permiten la selección de huéspedes transformados o transfectados. Los genes de marcadores incluyen resistencia a biocidas, por ejemplo, resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un huésped auxótrofo para proporcionar prototrofia y similares. Los genes de marcadores adecuados para los vectores de expresión divulgados en la presente memoria incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina y genes de resistencia a ampicilina.

El vector puede comprender un promotor natural o normativo operativamente unido a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales del mismo), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria a, o que se hibrida con, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. La selección de promotores, por ejemplo, fuertes, débiles, inducibles, específicos de tejido y específicos de desarrollo, se encuentra dentro de las habilidades habituales del experto. De manera similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor asimismo se encuentra dentro de las habilidades del experto. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de VSR y un promotor encontrado en la repetición terminal larga del virus de células madre murino.

Células huésped

En la presente memoria se proporcionan células huésped que comprenden un ácido nucleico o vector de la presente divulgación. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de célula que puede contener el vector divulgado en la presente memoria y puede producir un producto de expresión codificado por el ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, proteína). En algunos aspectos, la célula huésped es una célula adherente o una célula en suspensión, es decir, una célula que crece en suspensión. En diversos aspectos, la célula huésped es una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo, un ser humano. La célula huésped puede ser cualquier tipo de célula, puede originarse de cualquier tipo de tejido y puede ser de cualquier estadio de desarrollo.

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno es una proteína glucosilada y la célula huésped es una célula competente para la glucosilación. En diversos aspectos, la célula competente para la glucosilación es una célula eucariota, incluyendo, pero sin limitarse a, una célula de levadura, una célula de hongo filamentoso, una célula de protozoo, una célula de alga, una célula de insecto o una célula de mamífero. Tales células huésped se describen en la materia. Ver, por ejemplo, Frenzel, *et al.*, Front Immunol 4: 217 (2013). En diversos aspectos, las células eucariotas son células de mamífero. En diversos aspectos, las células de mamífero son células de mamífero no humano. En algunos aspectos, las células son células de ovario de hámster chino (CHO) y derivados de las mismas (por ejemplo, CHO-K1, CHO pro-3), células de mieloma de ratón (por ejemplo, NS0, GS-NS0, Sp2/0), células modificadas por ingeniería para ser deficientes en actividad de dihidrofolato reductasa (DHFR) (por ejemplo, DUKX-X11, DG44), células de riñón embrionario humano 293 (HEK293) o derivados de las mismas (por

ejemplo, HEK293T, HEK293-EBNA), células de riñón de mono verde africano (por ejemplo, células COS, células VERO), células de cáncer de cuello uterino humanas (por ejemplo, HeLa), células epiteliales de osteosarcoma óseo humanas U2-OS, células epiteliales basales alveolares humanas de adenocarcinoma A549, células de fibrosarcoma humanas HT1080, células de tumor de cerebro de ratón CAD, células de carcinoma embrionario P19, células de fibroblastos embrionarios de ratón NIH 3T3, células de fibroblastos de ratón L929, células de neuroblastoma de ratón N2a, células de cáncer de mama humanas MCF-7, células de retinoblastoma Y79, células de retinoblastoma humanas SO-Rb50, células de cáncer de hígado humanas Hep G2, células de mieloma B de ratón J558L, o células de riñón de cría de hámster (BHK) (Gaillet *et al.* 2007; Khan, *Adv Pharm Bull* 3(2): 257-263 (2013)).

Con fines de amplificar o replicar el vector, en algunos aspectos la célula huésped es una célula procariota, por ejemplo, una célula bacteriana.

La presente divulgación asimismo proporciona una población de células que comprende por lo menos una célula huésped descrita en la presente memoria. En algunos aspectos, la población de células es una población heterogénea que comprende la célula huésped que comprende vectores descritos, además de por lo menos otra célula, que no comprende ninguno de los vectores. Alternativamente, en algunos aspectos, la población de células es una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente células huésped (por ejemplo, que consisten esencialmente en) que comprenden el vector. En algunos aspectos, la población es una población clonal de células, en la que todas las células de la población son clones de una única célula huésped que comprende un vector, de tal manera que todas las células de la población comprenden el vector. En diversas puestas en práctica de la presente divulgación, la población de células es una población clonal que comprende células huésped que comprenden un vector tal como se describe en la presente memoria.

Métodos de producción

En la presente memoria asimismo se proporcionan métodos de producción de una proteína de unión a antígeno que se une a CLDN6. En diversas puestas en práctica, el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de unión a antígeno tal como se describe en la presente memoria en un medio de cultivo celular y recoger la proteína de unión a antígeno a partir del medio de cultivo celular. La célula huésped puede ser cualquiera de las células huésped descritas en la presente memoria. En diversos aspectos, la célula huésped se selecciona de entre el grupo que consiste en: células CHO, células NS0, células COS, células VERO y células BHK. En diversos aspectos, la etapa de cultivar una célula huésped comprende cultivar la célula huésped en un medio de crecimiento para soportar el crecimiento y la expansión de la célula huésped. En diversos aspectos, el medio de crecimiento aumenta la densidad celular, viabilidad de cultivo y productividad de una manera oportuna. En diversos aspectos, el medio de crecimiento comprende aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, glucosa y suero como fuente de factores de crecimiento, hormonas y factores de unión. En diversos aspectos, el medio de crecimiento es un medio completamente definido desde el punto de vista químico que consiste en aminoácidos, vitaminas, oligoelementos, sales inorgánicas, lípidos e insulina o factores de crecimiento de tipo insulina. Además de nutrientes, el medio de crecimiento asimismo ayuda a mantener el pH y la osmolalidad. Hay varios medios de crecimiento comercialmente disponibles y se describen en la materia. Ver, por ejemplo, Arora, "Cell Culture Media: A Review" *MATER METHODS* 3:175 (2013).

En diversos aspectos, el método comprende cultivar la célula huésped en un medio de alimentación. En diversos aspectos, el método comprende cultivar en un medio de alimentación en un modo semicontinuo. En la materia se conocen métodos de producción de proteína recombinante. Ver, por ejemplo, Li *et al.*, "Cell culture processes for monoclonal antibody production" *MAbs* 2(5): 466-477 (2010).

El método que produce una proteína de unión a antígeno puede comprender una o más etapas para purificar la proteína a partir de un cultivo celular o el sobrenadante del mismo y preferentemente recuperar la proteína purificada. En diversos aspectos, el método comprende una o más etapas de cromatografía, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de afinidad de proteína A), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba. En diversos aspectos, el método comprende purificar la proteína utilizando una resina de cromatografía de afinidad de proteína A.

En diversas puestas en práctica, el método comprende además etapas para formular la proteína purificada, etc., obteniendo de ese modo una formulación que comprende la proteína purificada. Tales etapas se describen en *Formulation and Process Development Strategies for Manufacturing*, eds. Jameel and Hershenson, John Wiley & Sons, Inc. (Hoboken, NJ), 2010.

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno unida a un polipéptido y la proteína de unión a antígeno forman parte de una proteína de fusión. Por tanto, la presente divulgación proporciona además métodos de producción de una proteína de fusión que comprende una proteína de unión a antígeno que se une a CLDN6. En diversas puestas en práctica, el método comprende cultivar una célula huésped que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión tal como se describe en la presente

memoria en un medio de cultivo celular y recoger la proteína de fusión a partir del medio de cultivo celular.

Conjugados

5 La presente divulgación asimismo proporciona proteínas de unión a antígeno conectadas, unidas o conjugadas a un segundo resto (por ejemplo, un resto heterólogo, un resto de conjugado). Por lo tanto, la presente divulgación proporciona un conjugado que comprende una proteína de unión a antígeno y un resto heterólogo. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "resto heterólogo" es sinónimo de "resto de conjugado" y se refiere a cualquier molécula (química o bioquímica, que se produce de manera natural o no codificada) que es diferente de las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación. Diversos restos heterólogos incluyen, pero no se limitan a, un polímero, un hidrato de carbono, un lípido, un ácido nucleico, un oligonucleótido, un ADN o ARN, un aminoácido, péptido, polipéptido, proteína, agente terapéutico (por ejemplo, un agente citotóxico, citocina) o un agente de diagnóstico.

15 En algunas puestas en práctica, el resto heterólogo es un polímero. El polímero puede estar ramificado o no ramificado. El polímero puede presentar cualquier peso molecular. En algunas puestas en práctica, el polímero presenta un peso molecular medio de entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa (indicando el término "aproximadamente" que, en preparaciones de un polímero soluble en agua, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular mencionado). En algunos aspectos, el peso molecular medio del polímero es de entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, entre aproximadamente 12 kDa y aproximadamente 40 kDa o entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 35 kDa.

25 En algunas puestas en práctica, el polímero está modificado para presentar un único grupo reactivo, tal como un éster activo para acilación o un aldehído para alquilación, de modo que puede controlarse el grado de polimerización. En algunas puestas en práctica, el polímero es soluble en agua de modo que la proteína a la que se une no precipita en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. En algunas puestas en práctica, cuando, por ejemplo, se utiliza la composición para utilización terapéutica, el polímero es farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente, en algunos aspectos, el polímero es una mezcla de polímeros, por ejemplo, un copolímero, un copolímero de bloque.

30 En algunas puestas en práctica, el polímero se selecciona de entre el grupo que consiste en: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos y derivados de los mismos incluyendo, polialquilenglicoles, poli(óxidos de alquilenos), poli(tereftalatos de alquilenos), polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, incluyendo poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo) y poli(acrilato de octadecilo), polímeros de polivinilo incluyendo poli(alcoholes vinílicos), poli(vinil éteres), poli(ésteres vinílicos), poli(haluros de vinilo), poli(acetato de vinilo) y polivinilporrolidona, poliglicóidos, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas incluyendo alquilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato-butarato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa, carboxietilcelulosa, triacetato de celulosa y sal sódica de sulfato de celulosa, polipropileno, polietilenos incluyendo polietilenglicol, poli(óxido de etileno) y poli(tereftalato de etileno), y poliestireno.

45 Un polímero soluble en agua particularmente preferido para su utilización en la presente memoria es polietilenglicol (PEG). Tal como se utiliza en la presente memoria, se pretende que polietilenglicol comprenda cualquiera de las formas de PEG que pueden utilizarse para derivatizar otras proteínas, tales como mono-(alcoxi C1-C10)- o ariloxi-polietilenglicol. PEG es un poliéter neutro lineal o ramificado, disponible en un amplio intervalo de pesos moleculares, y es soluble en agua y la mayoría de los disolventes orgánicos.

50 En algunas puestas en práctica, el resto heterólogo es un hidrato de carbono. En algunas puestas en práctica, el hidrato de carbono es un monosacárido (por ejemplo, glucosa, galactosa, fructosa), un disacárido (por ejemplo, sacarosa, lactosa, maltosa), un oligosacárido (por ejemplo, rafinosa, estaquiosa), un polisacárido (un almidón, amilasa, amilopectina, celulosa, quitina, calosa, laminarina, xilano, manano, fucoidano, galactomanano).

55 En algunas puestas en práctica, el resto heterólogo es un lípido. El lípido, en algunas puestas en práctica, es un ácido graso, eicosanoide, prostaglandina, leucotrieno, tromboxano, N-acil-etanolamina, glicerolípido (por ejemplo, glicerol mono-, di-, tri-sustituídos), glicerofosfolípido (por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina), esfingolípido (por ejemplo, esfingosina, ceramida), lípido de esteroide (por ejemplo, esteroide, colesterol), lípido de prenol, sacarolípido, o un policétido, aceite, cera, colesterol, esteroide, vitamina liposoluble, monoglicérido, diglicérido, triglicérido, un fosfolípido.

65 En algunas puestas en práctica, el resto heterólogo es un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser cualquiera de los conocidos en la materia. Los ejemplos de agentes terapéuticos que se contemplan en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, enzimas naturales, proteínas derivadas de fuentes naturales, proteínas recombinantes, péptidos naturales, péptidos sintéticos, péptidos cíclicos, anticuerpos, agonistas de receptor,

agentes citotóxicos, inmunoglobulinas, agentes bloqueantes beta-adrenérgicos, bloqueantes de canales de calcio, vasodilatadores coronarios, glicósidos cardíacos, antiarrítmicos, simpaticomiméticos cardíacos, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), diuréticos, inótrópos, reductores de colesterol y triglicéridos, secuestrantes de ácidos biliares, fibratos, inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilgluterilo (HMG)-CoA reductasa, derivados de niacina, agentes antiadrenérgicos, agentes bloqueantes alfa-adrenérgicos, agentes antiadrenérgicos de acción central, vasodilatadores, agentes de conservación de potasio, tiazidas y agentes relacionados, antagonistas de receptor de angiotensina II, vasodilatadores periféricos, antiandrógenos, estrógenos, antibióticos, retinoides, insulinas y análogos, inhibidores de la alfa-glucosidasa, biguanidas, meglitinidas, sulfonilureas, tiazolidindionas, andrógenos, progestógenos, reguladores del metabolismo óseo, hormonas hipofisarias anteriores, hormonas hipotalámicas, hormonas hipofisarias posteriores, gonadotropinas, antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina, estimulantes de la ovulación, moduladores de receptores de estrógenos selectivos, agentes antitiroideos, hormonas tiroideas, agentes formadores de masa, laxantes, antiperistálticos, modificadores de la flora, adsorbentes intestinales, antiinfecciosos intestinales, antianoréxicos, anticaquéticos, antibulímicos, supresores del apetito, agentes antiobesidad, antiácidos, agentes para el tracto gastrointestinal superior, agentes anticolinérgicos, derivados de ácido aminosalicílico, modificadores de la respuesta biológica, corticosteroides, antiespasmódicos, agonistas parciales de 5-HT₄, antihistamínicos, cannabinoides, antagonistas de la dopamina, antagonistas de la serotonina, citoprotectores, antagonistas del receptor de histamina H₂, agente protector de la mucosa, inhibidores de la bomba de protones, terapia de erradicación de *H. pylori*, estimulantes de eritropoyesis, agentes hematopoyéticos, agentes para anemia, heparinas, antifibrinolíticos, hemostáticos, factores de coagulación sanguínea, inhibidores de adenosín difosfato, inhibidores del receptor de glicoproteína, inhibidores de la unión de fibrinógenos-plaquetas, inhibidores de tromboxano A₂, activadores de plasminógeno, agentes antitrombóticos, glucocorticoides, mineralcorticoides, corticosteroides, agentes inmunosupresores selectivos, antifúngicos, fármacos que participan en terapia profiláctica, infecciones asociadas con SIDA, citomegalovirus, inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos, inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos, inhibidores de la proteasa, anemia, sarcoma de Kaposi, aminoglicósidos, agentes carbapenémicos, cefalosporinas, glicopéptidos, lincosamidas, macrólidos, oxazolidinonas, penicilinas, estreptograminas, sulfonamidas, trimetoprim y derivados, tetraciclinas, antihelmínticos, agentes amebianos, biguanidas, alcaloides de la quina, antagonistas de ácido fólico, derivados de quinolina, terapia de *Pneumocystis carinii*, hidrazidas, imidazoles, triazoles, nitroimidazoles, aminas cíclicas, inhibidores de la neuraminidasa, nucleósidos, agentes de unión a fosfato, inhibidores de la colinesterasa, terapia complementaria, barbituratos y derivados, benzodiazepinas, derivados de ácido gamma-aminobutírico, derivados de hidantoína, derivados de iminoestilbeno, derivados de succinimida, anticonvulsivos, alcaloides de cornezuelo, preparaciones antimigrañas, modificadores de la respuesta biológica, ésteres de ácido carbámico, derivados tricíclicos, agentes despolarizantes, agentes no despolarizantes, agentes paráliticos neuromusculares, estimulantes del SNC, reactivos dopaminérgicos, inhibidores de la monoamina oxidasa, inhibidores de COMT, sulfonatos de alquilo, etileniminas, imidazotetrazinas, análogos de mostaza nitrogenada, nitrosoureas, compuestos que contienen platino, antimetabolitos, análogos de purina, análogos de pirimidina, derivados de urea, antraciclinas, actinomicinas, derivados de camptotecina, epipodofilotoxinas, taxanos, alcaloides de la vinca y análogos, antiandrógenos, antiestrógenos, inhibidores de la aromataza no esteroideos, antineoplásicos inhibidores de la proteína cinasa, derivados de azaespirodecanodiona, ansiolíticos, estimulantes, inhibidores de la recaptación de monoaminda, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, antidepresivos, derivados de bencisooxazol, derivados de butirofenona, derivados de dibenzodiazepina, derivados de dibenzotiazepina, derivados de difenilbutilpiperidina, fenotiazinas, derivados de tienobenzodiazepina, derivados de tioxanteno, extractos alérgicos, agentes no esteroideos, antagonistas de receptor de leucotrieno, xantinas, antagonista de receptor de endotelina, prostaglandinas, tensioactivos pulmonares, mucolíticos, antimitóticos, uricosúricos, inhibidores de la xantina oxidasa, inhibidores de la fosfodiesterasa, sales de metenamina, derivados de nitrofurano, quinolonas, relajantes de músculos lisos, agentes parasimpaticomiméticos, hidrocarburos halogenados, ésteres de ácido amino-benzoico, amidas (por ejemplo lidocaína, clorhidrato de articaína, clorhidrato de bupivacaína), antipiréticos, hipnóticos y sedantes, ciclopirononas, pirazolopirimidinas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, opioides, derivados de para-aminofenol, inhibidor de la alcohol deshidrogenasa, antagonistas de heparina, adsorbentes, eméticos, antagonistas de opioides, reactivadores de la colinesterasa, terapia sustitutiva con nicotina, análogos y antagonistas de vitamina A, análogos y antagonistas de vitamina B, análogos y antagonistas de vitamina C, análogos y antagonistas de vitamina D, análogos y antagonistas de vitamina E, análogos y antagonistas de vitamina K.

Las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación pueden conjugarse a una o más citocinas y factores de crecimiento que son eficaces en la inhibición de la metástasis tumoral, y en las que se ha mostrado que la citocina o el crecimiento factor presenta un efecto antiproliferativo sobre por lo menos una población celular. Tales citocinas, linfocinas, factores de crecimiento u otros factores hematopoyéticos incluyen, pero no se limitan a: M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, TNF α , TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, trombopoyetina, factor de células madre y eritropoyetina. Los factores de crecimiento adicionales para su utilización en la presente memoria incluyen angiogenina, proteína morfogénica ósea 1, proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 3, proteína morfogénica ósea 4, proteína morfogénica ósea 5, proteína morfogénica ósea 6, proteína morfogénica ósea 7, proteína morfogénica ósea 8, proteína morfogénica ósea 9, proteína morfogénica ósea 10, proteína morfogénica ósea 11, proteína morfogénica ósea 12, proteína morfogénica ósea 13, proteína morfogénica ósea 14, proteína morfogénica ósea 15, receptor de proteína morfogénica ósea IA, receptor de proteína morfogénica ósea IB, factor

neurotrófico derivado de cerebro, factor neurotrófico ciliar, receptor de factor neurotrófico ciliar α , factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina 1, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina 2 α , factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocina 2 β , factor de crecimiento de células endoteliales β , endotelina 1, atractor de neutrófilos derivado de epitelio, receptor de factor neurotrófico derivado de línea celular de la glía α 1, receptor de factor neurotrófico derivado de línea celular de la glía α 2, proteína relacionada con el crecimiento, proteína relacionada con el crecimiento α , proteína relacionada con el crecimiento β , proteína relacionada con el crecimiento γ , factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento de tipo insulina I, receptor de factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de tipo insulina II, proteína de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de la leucemia, receptor de factor inhibidor de la leucemia α , factor de crecimiento nervioso, receptor de factor de crecimiento nervioso, neurotrofina 3, neurotrofina 4, factor estimulante del crecimiento de precélulas B, factor de células madre, receptor de factor de células madre, factor de crecimiento transformante α , factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento transformante β 1, factor de crecimiento transformante β 1.2, factor de crecimiento transformante β 2, factor de crecimiento transformante β 3, factor de crecimiento transformante β 5, factor de crecimiento transformante latente β 1, proteína de unión a factor de crecimiento transformante β I, proteína de unión a factor de crecimiento transformante β II, proteína de unión a factor de crecimiento transformante β III, receptor de factor de necrosis tumoral tipo I, receptor de factor de necrosis tumoral tipo II, receptor del activador de plasminógeno de tipo urocinasa, y proteínas quiméricas y fragmentos biológica o inmunológicamente activos de los mismos.

En algunas puestas en práctica, el conjugado comprende un compuesto tal como se describe en la presente memoria y un agente citotóxico. El agente citotóxico es cualquier molécula (química o bioquímica) que es tóxica para una célula. En algunos aspectos, cuando un agente citotóxico se conjuga a un compuesto de la presente divulgación, los resultados obtenidos son sinérgicos. Es decir, la eficacia de la terapia de combinación de un compuesto y el agente citotóxico es sinérgica, es decir, la eficacia es mayor que la eficacia prevista a partir de los efectos individuales aditivos de cada uno. Por tanto, puede reducirse la dosificación del agente citotóxico y, por tanto, se reduce de manera concomitante el riesgo de problemas de toxicidad y otros efectos secundarios. En algunas puestas en práctica, el agente citotóxico es un agente quimioterápico. En la materia se conocen agentes quimioterápicos e incluyen, pero no se limitan a, compuestos de coordinación de platino, inhibidores de topoisomerasa, antibióticos, alcaloides antimitóticos y difluoronucleósidos, tal como se describe en la patente US nº 6.630.124.

En algunas puestas en práctica, el agente quimioterápico es un compuesto de coordinación de platino. El término "compuesto de coordinación de platino" se refiere a cualquier compuesto de coordinación de platino que inhibe el crecimiento de células tumorales que proporciona el platino en forma de un ion. En algunas puestas en práctica, el compuesto de coordinación de platino es ion cis-diaminodiaquoplatino (II); cloruro de cloro(dietilentriamino)-platino (II); dicloro(etilendiamina)-platino (II); diamina(1,1-ciclobutanodicarboxilato) platino (II) (carboplatino); espiroplatino; iroplatino; diamina(2-etilmalonato)-platino (II); etilendiaminamalonatoplatino (II); aqua(1,2-diaminociclohexano)-sulfatoplatino (II); (1,2-diaminociclohexano)malonatoplatino (II); (4-carboxifalato)(1,2-diaminociclohexano)platino (II); (1,2-diaminociclohexano)-(isocitrato)platino (II); (1,2-diaminociclohexano)cis(piruvato)platino (II); (1,2-diaminociclohexano)oxalatoplatino (II); ormaplatino; y tetraplatino.

En algunas puestas en práctica, el cisplatino es el compuesto de coordinación de platino utilizado en las composiciones y métodos de la presente divulgación. El cisplatino está comercialmente disponible con el nombre PLATINOL™ de Bristol Myers-Squibb Corporation y está disponible como polvo para su reconstitución con agua, solución salina estéril u otro vehículo adecuado. Otros compuestos de coordinación de platino adecuados para su utilización en la presente divulgación se conocen y están comercialmente disponibles y/o pueden prepararse mediante técnicas convencionales. El cisplatino, o cis-diclorodiaminaplatino II, se ha utilizado satisfactoriamente durante muchos años como agente quimioterápico en el tratamiento de diversos tumores malignos sólidos humanos. Más recientemente, otros complejos de diamino-platino asimismo han mostrado eficacia como agentes quimioterápicos en el tratamiento de diversos tumores malignos sólidos humanos. Tales complejos de diamino-platino incluyen, pero no se limitan a, espiroplatino y carboplatino. Aunque el cisplatino y otros complejos de diamino-platino se han utilizado ampliamente como agentes quimioterápicos en seres humanos, han tenido que administrarse a altos niveles de dosificación que pueden conducir a problemas de toxicidad tales como daño renal.

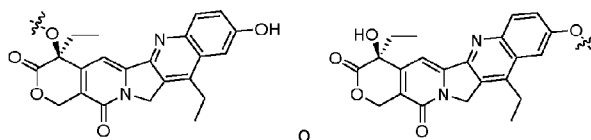
En algunas puestas en práctica, el agente quimioterápico es un inhibidor de topoisomerasa. Las topoisomerasas son enzimas que pueden alterar la topología del ADN en células eucariotas. Son críticas para funciones celulares y proliferación celular. Generalmente, existen dos clases de topoisomerasas en células eucariotas, tipo I y tipo II. La topoisomerasa I es una enzima monomérica con un peso molecular de aproximadamente 100,000. La enzima se une a ADN e introduce una rotura monocatenaria transitoria, desenrolla la doble hélice (o permite que se desenrolle), y posteriormente vuelve a sellar la rotura antes de disociarse de la cadena de ADN. Recientemente diversos inhibidores de topoisomerasa han mostrado eficacia clínica en el tratamiento de seres humanos afectados por cáncer de ovarios, cáncer de esófago o carcinoma de pulmón no microcítico.

En algunos aspectos, el inhibidor de topoisomerasa es camptotecina o un análogo de camptotecina. La camptotecina es un alcaloide citotóxico, insoluble en agua, producido por árboles *Camptotheca accuminata*

indígenos de China y árboles *Nothapodytes foetida* indígenas de la India. La camptotecina muestra actividad de inhibición del crecimiento de células tumorales frente a varias células tumorales. Los compuestos de la clase de análogos de camptotecina son normalmente inhibidores específicos de ADN topoisomerasa I. Mediante el término "inhibidor de topoisomerasa" pretende hacerse referencia a cualquier compuesto que inhibe el crecimiento de células tumorales que está estructuralmente relacionado a camptotecina. Los compuestos de la clase de análogos de camptotecina incluyen, pero no se limitan a; topotecán, irinotecán y 9-amino-camptotecina.

En puestas en práctica adicionales, el agente citotóxico es cualquier análogo de camptotecina que inhibe el crecimiento de células tumorales reivindicado o descrito en: la patente US nº 5.004.758, expedida el 2 de abril de 1991 y la solicitud de patente europea número 88311366.4, publicada el 21 de junio de 1989 como 20' número de publicación EP 0 321 122; la patente US nº 4.604.463, expedida el 5 de agosto de 1986 y la solicitud de patente europea con número de publicación EP 0 137 145, publicada el 17 de abril de 1985; la patente US nº 4.473.692, expedida el 25 de septiembre de 1984 y la solicitud de patente europea con número de publicación EP 0 074 256, publicada el 16 de marzo de 1983; la patente US nº 4.545.880, expedida el 8 de octubre de 1985 y la solicitud de patente europea con número de publicación EP 0 074 256, publicada el 16 de marzo de 1983; la solicitud de patente europea con número de publicación EP 0 088 642, publicada el 14 de septiembre de 1983; Wani *et al.*, J. Med. Chem., 29, 2358-2363 (1986); Nitta *et al.*, Proc. 14th International Congr. Chemotherapy, Kioto, 1985, Tokyo Press, Anticancer Section 1, págs. 28-30, especialmente un compuesto denominado CPT-11. CPT-11 es un análogo de camptotecina con una cadena lateral de 4-(piperidino)-piperidina unida a través de una unión carbamate en C-10 de 10-hidroxi-7-etil-camptotecina. CPT-11 está sometiéndose actualmente a ensayos clínicos con seres humanos y asimismo se denomina irinotecán; Wani *et al.*, J. Med. Chem., 23, 554 (1980); Wani *et al.*, J. Med. Chem., 30, 1774 (1987); la patente US nº 4.342.776, expedida el 3 de agosto de 1982; la solicitud de patente US nº de serie 581.916, presentada el 13 de septiembre de 1990 y la solicitud de patente europea con número de publicación EP 418 099, publicada el 20 de marzo de 1991; la patente US nº 4.513.138, expedida el 23 de abril de 1985 y la solicitud de patente europea con número de publicación EP 0 074 770, publicada el 23 de marzo de 1983; la patente US nº 4.399.276, expedida el 16 de agosto de 1983 y la solicitud de patente europea con número de publicación 0 056 692, publicada el 28 de julio de 1982. Todos los compuestos anteriormente indicados de la clase de análogos de camptotecina están comercialmente disponibles y/o pueden prepararse mediante técnicas convencionales incluyendo las descritas en las referencias anteriormente indicadas. El inhibidor de topoisomerasa puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en topotecán, irinotecán y 9-aminocamptotecina.

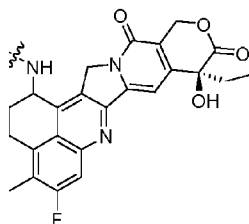
En algunas puestas en práctica, el análogo de camptotecina es un metabolito activo de irinotecán (CPT-11). En algunas de tales puestas en práctica, el análogo de camptotecina es 7-etil-10-hidroxycamptotecina (SN-38). Como metabolito, el SN-38 se forma mediante hidrólisis de irinotecán mediante carboxilesterasas. En algunas puestas en práctica, el SN-38 presenta una de las siguientes estructuras:



El SN-38 se ha descrito en la solicitud de patente US nº de serie 7.999.083; la solicitud de patente US nº de serie 8.080.250; la solicitud de patente US nº de serie 8.759.496; la solicitud de patente US nº de serie 8.999.344; la solicitud de patente US nº de serie 10.195.288; y la solicitud de patente US nº de serie 9.808.537.

En algunas puestas en práctica, el análogo de camptotecina es metanosulfonato de exatecán. El metanosulfonato de exatecán es una camptotecina soluble en agua (CPT) que muestra una actividad inhibidora de topoisomerasa I y actividad antitumoral más potentes que otros análogos de CPT. Además, exatecán es eficaz frente a células multirresistentes mediadas por p-glicoproteína (P-gp).

En algunas puestas en práctica, el análogo de camptotecina es deruxtecán (Dxd), un potente derivado de exatecán, que presenta una potencia de inhibición de la topoisomerasa I 10 veces mayor que SN-38. En algunas puestas en práctica, el Dxd presenta la siguiente estructura:



El Dxd se ha descrito en la solicitud de patente US nº de serie 6.407.115; la solicitud de patente US nº de serie 10.195.288; la solicitud de patente US nº de serie 9.808.537; y la solicitud de patente US nº de serie 6.407.115.

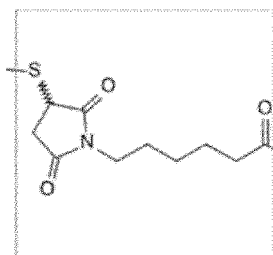
La preparación de numerosos compuestos de la clase de análogos de camptotecina (incluyendo sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptable de los mismos) así como la preparación de composiciones farmacéuticas orales y parenterales que comprende tales compuestos de la clase de análogos de camptotecina y un portador o diluyente inerte, farmacéuticamente aceptable, se describe ampliamente en la patente US nº 5.004.758, expedida el 2 de abril de 1991 y la solicitud de patente europea nº 88311366.4, publicada el 21 de junio de 1989 con el nº de publicación EP 0 321 122.

En aún otras puestas en práctica adicionales de la presente divulgación, el agente quimioterápico es un compuesto antibiótico. Los antibióticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, doxorubicina, mitomicina, bleomicina, daunorubicina y estreptozocina.

En algunas puestas en práctica, el agente quimioterápico es un alcaloide antimitótico. En general, los alcaloides antimitóticos pueden extraerse de *Cantharanthus roseus*, y se ha mostrado que son eficaces como agentes quimioterápicos anticancerosos. Se ha estudiado un gran número de derivados semisintéticos desde el punto de vista tanto químico como farmacológico (ver, O. Van Tellingen *et al*, Anticancer Research, 12, 1699-1716 (1992)). Los alcaloides antimitóticos de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, vinblastina, vincristina, vindesina, taxol y vinorelbina. Estos dos últimos alcaloides antimitóticos están comercialmente disponibles de Eli Lilly and Company, y Pierre Fabre Laboratories, respectivamente (ver la patente US nº 5.620.985). En una puesta en práctica, el alcaloide antimitótico es vinorelbina.

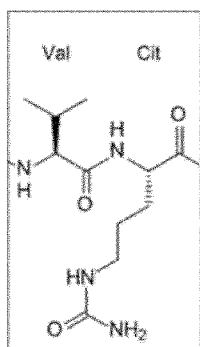
En otras puestas en práctica de la presente divulgación, el agente quimioterápico es un difluoronucleósido. En la materia es conocido que los 2'-desoxi-2',2'-difluoronucleósidos presentan actividad antiviral. Tales compuestos se divulgan y se enseñan en las patentes US nº 4.526.988 y 4.808.614. La publicación de solicitud de patente europea 184.365 da a conocer que estos mismos difluoronucleósidos presentan actividad oncolítica. En determinados aspectos, el 2'-desoxi-2',2'-difluoronucleósido utilizado en las composiciones y métodos de la presente divulgación es clorhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina, asimismo conocido como clorhidrato de gemcitabina. La gemcitabina está comercialmente disponible o puede sintetizarse en un procedimiento de múltiples etapas tal como se da a conocer y se enseña en las patentes US nº 4.526.988, 4.808.614 y 5.223.608.

En diversos aspectos, el agente quimioterápico es un agente antimitótico que inhibe la división celular bloqueando la polimerización de tubulina, desestabilizando microtúbulos o alterando la dinámica de microtúbulos, por ejemplo, maitansinoide o un derivado del mismo (por ejemplo, DM1 o DM4), auristatina o un derivado de la misma. En diversos casos, el agente quimioterápico es una auristatina. Por ejemplo, en algunos aspectos, la auristatina es dolastatina, monometil-auristatina E (MMAE), monometilo-auristatina E (MMAE) o PF-06380101. Las auristatinas se describen en la materia. Ver, por ejemplo, Maderna, A.; *et al.*, Mol Pharmaceutics 12(6): 1798-1812 (2015). En diversos aspectos, el conjugado comprende un anticuerpo de la presente divulgación en combinación con MMAE. Opcionalmente, el conjugado comprende un conector. En algunos aspectos, el conector comprende un resto de unión escindible. En diversos casos, el conjugado comprende un anticuerpo de la presente divulgación unido a un conector que está unido a un conector escindible por catepsina, que a su vez está unido a un espaciador que está unido a MMAE. En aspectos, el conector está unido al anticuerpo mediante un residuo de Cys de la región Fc del anticuerpo. En aspectos ejemplificativos, el conector comprende la estructura de la fórmula I:



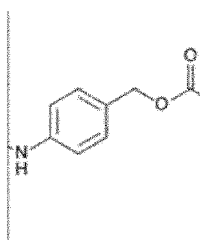
[Fórmula I]

En aspectos ejemplificativos, el conector escindible por catepsina comprende la estructura de la fórmula II:



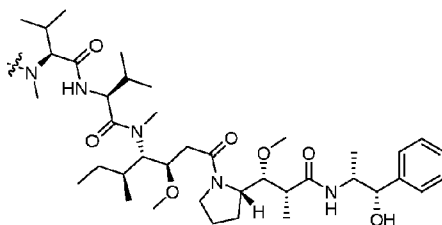
[Fórmula II]

En aspectos ejemplificativos, el espaciador comprende la estructura de la fórmula III:



[Fórmula III]

En algunas puestas en práctica, MMAE presenta la siguiente estructura:



La presente divulgación asimismo proporciona conjugados que comprenden una proteína de unión a antígeno de la presente divulgación unida a un polipéptido, de tal manera que el conjugado es una proteína de fusión. Por tanto, la presente divulgación proporciona proteínas de fusión que comprenden una proteína de unión a antígeno de la presente divulgación unida a un polipéptido. En diversas puestas en práctica, el polipéptido es un marcador de diagnóstico, por ejemplo, una proteína fluorescente, tal como proteína verde fluorescente, u otra etiqueta, por ejemplo, etiqueta Myc. En diversos aspectos, el polipéptido es una de las citocinas, linfocinas, factores de crecimiento u otros factores hematopoyéticos indicados anteriormente.

Grupos de unión

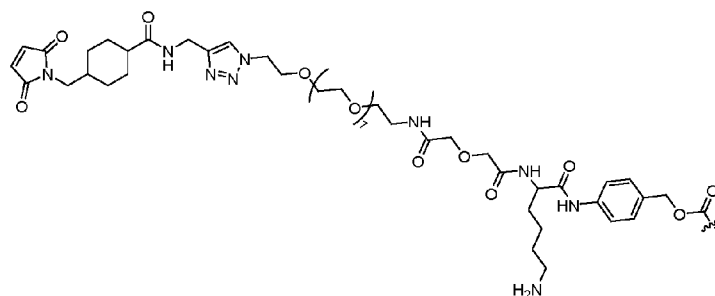
En algunas puestas en práctica, el conjugado está directamente unido al resto heterólogo. En puestas en práctica alternativas, el conjugado comprende un conector que une el compuesto de la presente divulgación al resto heterólogo. En algunos aspectos, el conector comprende una cadena de átomos de desde 1 hasta aproximadamente 60 o de 1 a 30 átomos o más, de 2 a 5 átomos, de 2 a 10 átomos, de 5 a 10 átomos o de 10 a 20 átomos de longitud. En algunas puestas en práctica, la cadena átomos son todos átomos de carbono. En algunas puestas en práctica, la cadena átomos en la estructura principal del conector se seleccionan de entre el grupo que consiste en C, O, N y S. Los átomos de cadena y conectores pueden seleccionarse según su solubilidad prevista (hidrofilia) para proporcionar un conjugado más soluble. En algunas puestas en práctica, el conector proporciona un grupo funcional que se somete a escisión por una enzima u otro catalizador o condiciones hidrolíticas encontradas en el tejido u órgano o célula diana. En algunas puestas en práctica, la longitud del conector es lo suficientemente larga como para reducir el potencial de impedimento estérico. En algunas puestas en práctica, el conector es un aminoácido o un conector de peptidilo. Tales conectores de peptidilo pueden presentar cualquier longitud. Diversos conectores presentan desde aproximadamente 1 hasta 50 aminoácidos de longitud, de 5 a 50, de 3 a 5, de 5 a 10, de 5 a 15 o de 10 a 30 aminoácidos de longitud.

En la materia es conocida una variedad de conectores adecuados. El conector puede escindirse (un conector escindible), por ejemplo, en condiciones fisiológicas, por ejemplo, en condiciones intracelulares, de tal manera que la escisión del conector libera el fármaco en el entorno intracelular. Alternativamente, el conector puede escindirse en condiciones extracelulares, por ejemplo, fuera de las células tumorales o en las inmediaciones de la masa tumoral, de tal manera que la escisión del conector libera el fármaco que penetra preferentemente al interior de las células tumorales. En otras puestas en práctica, el conector no puede escindirse (un conector no escindible), y el fármaco se libera, por ejemplo, mediante degradación por anticuerpos.

El conector puede unirse a un grupo químicamente reactivo en el resto de anticuerpo, por ejemplo, a un grupo amino, imino, hidroxilo, tiol o carboxilo libre (por ejemplo, al extremo N o C-terminal, al grupo amino épsilon de uno o más residuos de lisina, al grupo ácido carboxílico libre de uno o más residuos de ácido glutámico o ácido aspártico, al grupo sulfhidrilo de uno o más residuos de cisteinilo, o al grupo hidroxilo de uno o más residuos de serina o treonina). El sitio al que se une el conector puede ser un residuo natural en la secuencia de aminoácidos del resto de anticuerpo, o puede introducirse en el resto de anticuerpo, por ejemplo, mediante tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, introduciendo un sitio de escisión de proteasa o cisteína en la secuencia de aminoácidos) o mediante bioquímica de proteínas (por ejemplo, reducción, ajuste del pH o proteólisis). El sitio al que se une el conector asimismo puede ser un aminoácido no natural. El sitio al que se une el conector asimismo puede ser un glicano en el anticuerpo.

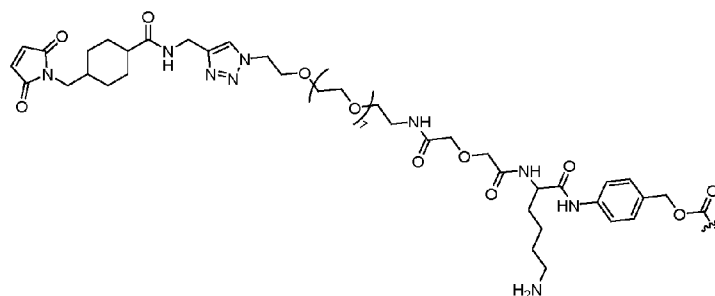
Normalmente, el conector es sustancialmente inerte en condiciones para las que se unen los dos grupos que conecta. El término "agente de reticulación bifuncional", "conector bifuncional" o "agente de reticulación" se refiere a un agente de modificación presenta dos grupos reactivos en cada extremo del conector, de tal manera que un grupo reactivo puede hacerse reaccionar en primer lugar con el compuesto citotóxico para proporcionar un compuesto que porta el resto de conector y un segundo grupo reactivo, que puede reaccionar entonces con el anticuerpo. Alternativamente, un extremo del agente de reticulación bifuncional puede hacerse reaccionar en primer lugar con el anticuerpo para proporcionar un anticuerpo que porta un resto de conector y un segundo grupo reactivo, que puede reaccionar entonces con el compuesto citotóxico. El resto de unión puede contener un enlace químico que permite la liberación del resto citotóxico en un sitio particular. En la materia son bien conocidos enlaces químicos adecuados e incluyen enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces lábiles en condiciones ácidas, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles frente a proteasa/peptidasa y enlaces lábiles frente a esterasa. Ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.208.020; 5.475.092; 6.441.163; 6.716.821; 6.913.748; 7.276.497; 7.276.499; 7.368.565; 7.388.026 y 7.414.073. En algunas puestas en práctica, los enlaces son enlaces disulfuro, tioéter y/o enlaces lábiles frente a proteasa/peptidasa. Otros conectores que pueden utilizarse en la presente divulgación incluyen conectores no escindibles, tales como los descritos en detalle en el documento US 20050169933, conectores cargados o conectores hidrófilos, tales como los descritos en los documentos US 2009/0274713, US 2010/0129314 y WO 2009/134976.

En algunas puestas en práctica, el conector es un conector hidrófilo que confiere hidrofiliia al conjugado. En algunas puestas en práctica, el conector hidrófilo comprende polietilenglicol (PEG). En algunas puestas en práctica, el conector hidrófilo es CL2A. En algunas puestas en práctica, el conector CL2A presenta la siguiente estructura:



CL2A se ha descrito en las patentes US nº 8.080.250; 8.759.496; y 10.195.288.

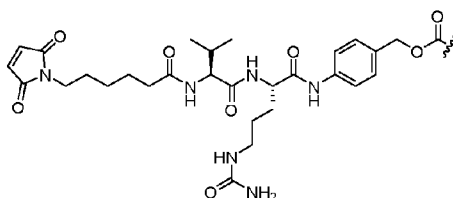
En algunas puestas en práctica, el conector hidrófilo es CL2E. En algunas puestas en práctica, CL2E presenta la siguiente estructura:



CL2E se ha descrito en las patentes US nº 8.080.250; 8.759.496; y 10.195.288.

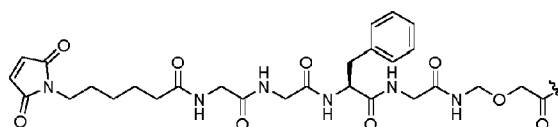
- 5 En algunas puestas en práctica, el conector puede escindirse mediante un agente de escisión que está presente en el entorno intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El conector puede ser, por ejemplo, un conector peptídico que se escinde mediante una enzima peptidasa o proteasa intracelular o extracelular, incluyendo, pero sin limitarse a, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunas puestas en práctica, el conector peptídico comprende por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro o por lo menos cinco aminoácidos de longitud.

En algunas puestas en práctica, el conector peptídico es MC-VC-PAB, que comprende residuos de valina y citrulina. En algunas puestas en práctica, el conector MC-VC-PAB presenta la siguiente estructura:



MC-VC-PAB se ha descrito en las patentes US nº 7.659.241; 7.829.531; 6.884.869; 6.214.345; y 6.214.345.

- 20 En algunas puestas en práctica, el conector peptídico es maleimidocaproil-glicina-glicina-fenilalanina-glicina (MC-GGFG). En algunas puestas en práctica, el conector MC-GGFG presenta la siguiente estructura:



MC-GGFG se ha descrito en las patentes US nº 9.808.537 y 10.195.288.

- 25 En otras puestas en práctica, el conector escindible es sensible al pH, es decir, sensible a hidrólisis a determinados valores de pH. En algunas puestas en práctica, el conector sensible al pH puede hidrolizarse en condiciones ácidas. Por ejemplo, puede utilizarse un conector lábil en condiciones ácidas que es en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetel similares) (ver, por ejemplo, las patentes US nº 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville *et al*, 1989, Biol. Chem. 264: 14653-14661). Tales conectores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como las de la sangre, pero son inestables por debajo de pH 5.5 o 5.0, el pH aproximado del lisosoma. En determinadas puestas en práctica, el conector hidrolizable es un conector tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico mediante un enlace de acilhidrazona (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.622.929).

- En otras puestas en práctica, el conector puede escindirse en condiciones reductoras (por ejemplo, un conector disulfuro). Los agentes de reticulación bifuncionales que permiten la unión de un anticuerpo con compuestos citotóxicos mediante enlaces disulfuro incluyen, pero no se limitan a, N-succinimidil-4-(4-nitropiridil-2-ditio)butanoato, 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-sulfobutanoato (sulfo-SPDB). Sulfo-SPDB se describe, por ejemplo, en la patente US nº 8.236.319. Alternativamente, pueden utilizarse agentes de reticulación que introducen grupos tiol tales como 2-iminotiolano, homocisteína-tiolactona o anhídrido S-acetilsuccínico. En otras puestas en práctica, el conector puede contener una combinación de uno o más de los conectores peptídicos, sensibles al pH o de disulfuro descritos anteriormente.

Los "agentes de reticulación heterobifuncionales" son agentes de reticulación bifuncionales que presentan dos

grupos reactivos diferentes. Asimismo pueden utilizarse agentes de reticulación heterobifuncionales que contienen tanto un grupo N-hidroxisuccinimida reactivo con amina (grupo NHS) como un grupo hidrazina reactivo con carbonilo para unir compuestos citotóxicos con un anticuerpo. Los ejemplos de tales agentes de reticulación heterobifuncionales comercialmente disponibles incluyen succinimidil-6-hidrazinonicotinamida-acetona-hidrazona (SANH), clorhidrato de 4-hidrazidotereftalato de succinimidilo (SHTH) y clorhidrato de nicotinato de succinimidil-hidrazinio (SHNH). Asimismo pueden prepararse conjugados que portan un conector lábil en condiciones ácidas utilizando un derivado de benzodiazepina que porta hidrazina de la presente divulgación. Los ejemplos de agentes de reticulación bifuncionales que pueden utilizarse incluyen p-formil-benzoato de succinimidilo (SFB) y p-formilfenoxiacetato de succinimidilo (SFPA).

Los conectores descritos en la presente memoria pueden utilizarse en cualquier combinación con el resto heterólogo descrito en la presente memoria. Todos los conectores anteriormente indicados y restos heterólogos descritos en la presente memoria están comercialmente disponibles y/o pueden prepararse mediante técnicas convencionales incluyendo las descritas en las referencias anteriormente indicadas.

Conjugación

La razón de resto heterólogo con respecto a proteína de unión a antígeno (HAR) representa el número de un resto heterólogo unido por cada molécula de unión a antígeno. En algunas puestas en práctica, la HAR oscila desde 1 hasta 15, de 1 a 10, de 1 a 9, de 1 a 8, de 1 a 7, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3 o de 1 a 2. En algunas puestas en práctica, la HAR oscila desde 2 hasta 10, de 2 a 9, de 2 a 8, de 2 a 7, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4 o de 2 a 3. En otras puestas en práctica, la HAR es de aproximadamente 2, aproximadamente 2.5, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5 o aproximadamente 6. En algunas puestas en práctica, la HAR oscila desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4. La HAR puede caracterizarse mediante medios convencionales tales como espectrometría de masas, espectroscopía UV/Vis, ensayo ELISA y/o HPLC.

En algunas puestas en práctica, los conjugados son conjugados heterogéneos (asimismo denominados "convencionales"), en los que las proteínas de unión a antígeno se conjugan a un número diferente del resto heterólogo. En algunas puestas en práctica, los conjugados heterogéneos siguen una distribución gaussiana o distribución casi gaussiana de los conjugados, en los que la distribución se centra en el valor de carga de resto heterólogo medio con algunas proteínas de unión a antígeno conjugadas más que la media y algunas proteínas de unión a antígeno conjugadas menos que la media.

En algunas puestas en práctica, los conjugados son conjugados homogéneos, en los que el porcentaje sustancial de las proteínas de unión a antígeno están conjugadas a un número definido del resto heterólogo. En algunas puestas en práctica, los conjugados homogéneos comprenden la HAR de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. En algunas puestas en práctica, los conjugados homogéneos comprenden la HAR de 2, 4, 6 o 8. En puestas en práctica preferidas, los conjugados homogéneos comprenden la HAR de 4. En otras puestas en práctica preferidas, los conjugados homogéneos comprenden la HAR de 2. En algunas puestas en práctica, los conjugados homogéneos comprenden más de o igual al 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 por ciento de conjugados con la HAR definida. En algunas puestas en práctica, los conjugados homogéneos comprenden aproximadamente 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 por ciento de conjugados con la HAR definida. En algunas puestas en práctica, los conjugados homogéneos comprenden por lo menos 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 por ciento de conjugados con la HAR definida. En algunas puestas en práctica, los conjugados homogéneos comprenden la distribución de HAR que no es una distribución gaussiana o casi gaussiana. En algunas puestas en práctica, la homogeneidad de los conjugados homogéneos se determina mediante un cromatograma, por ejemplo, HPLC o cualquier cromatografía adecuada. En algunas puestas en práctica, el cromatograma es un cromatograma de HIC. El conjugado homogéneo puede generarse mediante una conjugación específica de sitio.

En algunas puestas en práctica, el resto heterólogo se conjuga a la proteína de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo) de una manera específica del sitio. En la materia se conocen diversos métodos de conjugación específica del sitio, por ejemplo, Thiomab o TDC o conjugación en un residuo de cisteína no emparejado (Junutula *et al.* (2008) Nat. Biotechnol. 26:925-932; Dimasi *et al.* (2017) Mol. Pharm. 14:1501-1516; Shen *et al.* (2012) Nat. Biotechnol. 30:184-9); conector de puente de tiol (Behrens *et al.* (2015) Mol. Pharm. 12:3986-98); conjugación en glutamina utilizando una transglutaminasa (Dennler *et al.* (2013) Methods Mol. Bio. 1045:205-15; Dennler *et al.* (2014) Bioconjug Chem. 25:569-78); conjugación en residuos de aminoácido no naturales modificados por ingeniería (Axup *et al.* (2012) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 104:16101-6; Tian *et al.* (2014) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 111:1766-71; VanBrunt *et al.* (2015) Bioconjug Chem 26:2249-60; Zimmerman *et al.* (2014) Bioconjug Chem 25:351-61); conjugación de selenocisteína (Li *et al.* (2017) Cell Chem Biol 24:433-442); conjugación mediada por glicano (Okeley *et al.* (2013) Bioconjug Chem 24:1650-5); conjugación en análogos de GalNAc o galactosa (Ramakrishnan y Qasba (2002) J Biol Chem 277:20833-9; van Geel *et al.* (2015) Bioconjug Chem 26:2233-42); mediante modificación por ingeniería de glicano (Zhou *et al.* (2014) Bioconjug Chem 25:510-20; Tang *et al.* (2017) Nat Protoc 12:1702-1721); mediante una etiqueta peptídica corta, tal como modificación por ingeniería con una etiqueta de glutamina o transpeptidación mediada por sortasa A (Strop *et al.* (2013) Chem Biol 20:161-7; Beerli *et*

al. (2015) PLoS One 10:e0131177); y mediante una etiqueta de aldehído (Wu *et al.* (2009) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 106:3000-5).

Imprevisibilidad del conjugado (por ejemplo, ADC)

No es posible predecir por adelantado, basándose simplemente en un perfil de anticuerpo, o un perfil de carga útil de fármaco, qué conjugados de anticuerpo-fármaco serán suficientemente seguros y eficaces para aplicaciones clínicas. Por ejemplo, una carga útil de fármaco particular puede funcionar perfectamente bien cuando se conjuga a un anticuerpo dirigido hacia una diana, pero puede no funcionar en absoluto igual de bien cuando se conjuga a un anticuerpo dirigido hacia una diana diferente, o incluso a un anticuerpo diferente dirigido hacia la misma diana. El porqué de que diferentes conjugados de anticuerpo-fármaco presenten diferente actividad antitumoral *in vivo* no se entiende lo suficientemente bien como para permitir predicciones precisas en el diseño de nuevos conjugados de anticuerpo-fármaco. Se especula que interviene una interacción impredecible de muchos factores. Estos factores pueden incluir, por ejemplo, la afinidad de unión de un conjugado de anticuerpo-fármaco a un antígeno diana, la capacidad del conjugado para penetrar en tumores sólidos, así como la semivida en circulación para una exposición apropiada a tumores sin provocar toxicidad.

La complejidad e imprevisibilidad están bien demostradas por la afinidad de anticuerpo por sí sola. Los anticuerpos o conjugados de anticuerpo-fármaco con alta afinidad corresponden a una mejor captación celular, lo cual conduce a un nivel superior de las cargas útiles citotóxicas liberadas dentro de las células. Asimismo es conocido que una afinidad superior potencia la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Todos estos atributos favorecen la propiedad de destrucción celular de conjugados de anticuerpo-fármaco. Sin embargo, asimismo es conocido que la alta afinidad de un anticuerpo o conjugado de anticuerpo-fármaco puede impedir una penetración de tumor eficiente mediante un "efecto de barrera de antígeno", lo que sugiere que, con el fin de lograr una fuerte actividad antitumoral *in vivo*, la afinidad del conjugado de anticuerpo-fármaco presenta que ser la correcta: ni demasiado alta ni demasiado baja. Hasta ahora, no se sabe cómo predecir cuál será el nivel de afinidad más eficiente o eficaz para un conjugado de anticuerpo-fármaco.

Además, la actividad antitumoral *in vivo* no puede predecirse mediante el mecanismo de conectores y cargas útiles por sí solo. Por ejemplo, O. Ab *et al.*, Mol. Cancer Ther. 14(8): 1605-1613 (2015) demostraron que, cuando se somete a prueba en modelos de cáncer preclínicos, el mismo anticuerpo conjugado a la misma toxina anti-tubulina mediante diferentes conectores mostró actividad antitumoral drásticamente diferente. Este ejemplo es particularmente sorprendente porque las estructuras químicas de los dos conectores son muy similares. Además, el conector presente en el conjugado superior contenía un resto hidrófilo. Los metabolitos hidrófilos son generalmente menos permeables en la membrana y se cree que presentan un flujo más lento a partir de los lisosomas (el sitio de degradación de conjugado), conduciendo a un retardo en la actividad anti-tubulina de la carga útil liberada. Este hallazgo es un argumento a favor de una cinética "ideal" del suministro de carga útil, pero, hasta la fecha, no existe ninguna información sobre qué constituye tal cinética. Para aumentar esta complejidad, existe la pregunta sin respuesta sobre si la cinética ideal del suministro de carga útil, aunque se defina para un tipo de célula particular, se aplicará a todos los tipos de células. Por tanto, no es posible predecir la actividad antitumoral *in vivo* más eficaz simplemente a partir de la composición química del conector o la carga útil.

Composiciones, composiciones farmacéuticas y formulaciones

En la presente memoria se proporcionan composiciones que comprenden una proteína de unión a antígeno, un ácido nucleico, un vector, una célula huésped o un conjugado tal como se dan a conocer en la presente memoria. En algunos aspectos, las composiciones comprenden las proteínas de unión a antígeno en forma aislada y/o purificada. En algunos aspectos, la composición comprende un único tipo (por ejemplo, estructura) de una proteína de unión a antígeno de la presente divulgación o comprende una combinación de dos o más proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación, en la que la combinación comprende dos o más proteínas de unión a antígeno de diferentes tipos (por ejemplo, estructuras).

En algunos aspectos, la composición comprende agentes que potencian las características fisicoquímicas de la proteína de unión a antígeno, por ejemplo, estabilizando la proteína de unión a antígeno a determinadas temperaturas, por ejemplo, temperatura ambiente, aumentando la vida útil de almacenamiento, reduciendo la degradación, por ejemplo, degradación mediada por proteasa de oxidación, aumentando la semivida de la proteína de unión a antígeno, etc. En algunos aspectos, la composición comprende cualquiera de los agentes divulgados en la presente memoria como resto heterólogo o resto de conjugado, opcionalmente en mezcla con las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación o conjugados a las proteínas de unión a antígeno.

En diversos aspectos de la presente divulgación, la composición comprende adicionalmente un portador, diluyentes o excipiente farmacéuticamente aceptables. En algunas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno, un ácido nucleico, un vector, una célula huésped o un conjugado tal como se divulgan en la presente memoria (denominados a continuación en la presente memoria "agentes activos") se formula para proporcionar una composición farmacéutica que comprende el agente activo, junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Con respecto a esto, la presente divulgación proporciona además composiciones

farmacéuticas que comprenden un agente activo que está destinado para su administración a un sujeto, por ejemplo, un mamífero.

En algunas puestas en práctica, el agente activo está presente en la composición farmacéutica a un nivel de pureza adecuado para su administración a un paciente. En algunas puestas en práctica, el agente activo presenta un nivel de pureza de por lo menos aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 %, y un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas puestas en práctica, las composiciones contienen un agente activo a una concentración de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 30.0 mg/ml.

En diversos aspectos, las composiciones farmacéuticas comprenden un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los portadores farmacéuticos convencionales, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite, y diversos tipos de agentes humectantes. El término asimismo comprende cualquiera de los agentes aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal de los EE. UU. o indicados en la farmacopea estadounidense para su utilización en animales, incluyendo seres humanos.

La composición farmacéutica puede comprender cualquier componente farmacéuticamente aceptable, incluyendo, por ejemplo, agentes acidificantes, aditivos, adsorbentes, propelentes de aerosoles, agentes de desplazamiento de aire, agentes alcalizantes, agentes antiaglomerantes, anticoagulantes, conservantes antimicrobianos, antioxidantes, antisépticos, bases, aglutinantes, agentes tamponantes, agentes quelantes, agentes de recubrimiento, agentes colorantes, desecantes, detergentes, diluyentes, desinfectantes, disgregantes, agentes dispersantes, agentes potenciadores de la disolución, tintes, emolientes, agentes emulsionantes, estabilizadores de la emulsión, cargas, agentes formadores de película, potenciadores del sabor, agentes aromatizantes, potenciadores del flujo, agentes gelificantes, agentes de granulación, humectantes, lubricantes, mucoadhesivos, bases de pomada, pomadas, vehículos oleaginosos, bases orgánicas, bases de pastillas, pigmentos, plastificantes, agentes de pulido, conservantes, agentes secuestrantes, agentes de penetración en la piel, agentes solubilizantes, disolventes, agentes estabilizantes, bases de supositorio, agentes tensioactivos, tensioactivos, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes terapéuticos, agentes espesantes, agentes de tonicidad, agentes de toxicidad, agentes de aumento de la viscosidad, agentes de absorción de agua, codisolventes miscibles en agua, descalcificadores de agua o agentes humectantes. Ver, por ejemplo, el Handbook of Pharmaceutical Excipients, tercera edición, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, Londres, R. U., 2000). Remington's Pharmaceutical Sciences, decimosexta edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980).

En diversos aspectos, la composición farmacéutica comprende materiales de formulación que no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones utilizadas. En puestas en práctica específicas, las composiciones farmacéuticas comprenden un agente activo y una o más sales farmacéuticamente aceptables; polioles; tensioactivos; agentes de equilibrio osmótico; agentes de tonicidad; antioxidantes; antibióticos; antimicóticos; agentes formadores de masa; lioprotectores; agentes antiespumantes; agentes quelantes; conservantes; colorantes; analgésicos; o agentes farmacéuticos adicionales. En diversos aspectos, la composición farmacéutica comprende uno o más polioles y/o uno o más tensioactivos, opcionalmente, además de uno o más excipientes, incluyendo, pero sin limitarse a, sales farmacéuticamente aceptables; agentes de equilibrio osmótico (agentes de tonicidad); antioxidantes; antibióticos; antimicóticos; agentes formadores de masa; lioprotectores; agentes antiespumantes; agentes quelantes; conservantes; colorantes; y analgésicos.

En determinadas puestas en práctica, la composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, isotonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, tasa de disolución o liberación, adsorción o penetración de la composición. En tales puestas en práctica, los materiales formulación adecuados incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogeno-sulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes formadores de masa (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); cargas; monosacáridos; disacáridos; y otros hidratos de carbono (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes; agentes emulsionantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno); disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcar (tales como manitol o sorbitol); agentes de suspensión; tensioactivos o agentes humectantes (tales como compuestos de tipo Pluronic, PEG, ésteres de sorbitano, polisorbato tales como polisorbato 20, polisorbato, Triton, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol); agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos, preferentemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos

de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. Ver, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª edición, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para alcanzar un pH fisiológicamente compatible. En algunas puestas en práctica, el pH de la composición farmacéutica puede ser, por ejemplo, de entre aproximadamente 4 o aproximadamente 5 y aproximadamente 8.0 o aproximadamente 4.5 y aproximadamente 7.5 o de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 7.5. En diversas puestas en práctica, el pH de la composición farmacéutica es de entre 5.5 y 7.5.

10 La presente divulgación proporciona métodos de producción de una composición farmacéutica. En diversos aspectos, el método comprende combinar la proteína de unión a antígeno, conjugado, proteína de fusión, ácido nucleico, vector, célula huésped o una combinación de los mismos, con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 Vías de administración

Con respecto a la presente divulgación, el agente activo, o la composición farmacéutica que comprende el mismo, puede administrarse al sujeto mediante cualquier vía de administración adecuada. Por ejemplo, el agente activo puede administrarse a un sujeto mediante administración parenteral, nasal, oral, pulmonar, tópica, vaginal o rectal. 20 La siguiente exposición sobre vías de administración se proporciona simplemente para ilustrar diversas puestas en práctica y no debe interpretarse como limitativa del alcance de ninguna manera.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles, isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con respecto a la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. El término "parenteral" significa que no se realiza a través del canal alimentario sino por alguna otra vía tal como subcutánea, intramuscular, intraespinal o intravenosa. El agente activo de la presente divulgación puede administrarse con un diluyente fisiológicamente aceptable en un portador farmacéutico, tal como 25 un líquido estéril o mezcla de líquidos, incluyendo agua, solución salina, dextrosa acuosa y disoluciones de azúcar relacionadas, un alcohol, tal como etanol o alcohol hexadecílico, un glicol, tal como propilenglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, cetales tales como 2,2-dimetil-153-dioxolano-4-metanol, éteres, polietilenglicol 400, aceites, ácidos grasos, ésteres o glicéridos de ácidos grasos, o glicéridos de ácidos grasos acetilados con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión, 30 tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

Los aceites que pueden utilizarse en formulaciones parenterales incluyen aceites de petróleo, animales, vegetales o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen de cacahuetes, semilla de soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, petrolato y mineral. Los ácidos grasos adecuados para su utilización en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados. 40

Los jabones adecuados para su utilización en formulaciones parenterales incluyen sales de metales alcalinos grasos, amonio y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetil-dialquil-amonio, y haluros de alquil-piridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicérido, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de amina grasa, alcanolamidas de ácido graso y copolímeros de polioxietileno-polipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, alquil-β-aminopropionatos, y sales de amonio cuaternario de 2-alquil-imidazolina, y (e) mezclas de los mismos. 45 50

Las formulaciones parenterales en algunas puestas en práctica contienen desde aproximadamente 0.5 % hasta aproximadamente 25 % en peso del agente activo de la presente divulgación en disolución. Pueden utilizarse conservantes y tampones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de la inyección, tales composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que presentan un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de desde aproximadamente 12 hasta aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en tales formulaciones oscilará normalmente desde aproximadamente 5 % hasta aproximadamente 15 % en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácido graso de polietilenglicol-sorbitano, tales como monooleato de sorbitano y los aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados mediante la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales en algunos aspectos se presentan en recipientes sellados de dosis unitaria o de múltiples dosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que únicamente requiere la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de utilizarse. En algunos aspectos se preparan disoluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles de la clase anteriormente descrita. 55 60 65

Las formulaciones inyectables son según la presente divulgación. Los requisitos para portadores farmacéuticos eficaces para composiciones inyectables los conocen bien los expertos ordinarios en la materia (ver, por ejemplo, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, Filadelfia, PA, Banker and Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982), y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ª ed., páginas 622-630 (1986)).

Dosificaciones

Se cree que los agentes activos de la divulgación son útiles en métodos de inhibición del crecimiento tumoral, así como otros métodos, tal como se describe adicionalmente en la presente memoria, incluyendo métodos de tratamiento o prevención del cáncer. En el contexto de la divulgación, la cantidad o dosis del agente activo administrada debe ser suficiente para producir, por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica, en el sujeto o animal a lo largo de un intervalo de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del agente activo de la presente divulgación debe ser suficiente para tratar cáncer tal como se describe en la presente memoria en un periodo de desde aproximadamente 1 hasta 4 minutos, de 1 a 4 horas o de 1 a 4 semanas o más, por ejemplo, de 5 a 20 o más semanas, desde el momento de la administración. En determinadas puestas en práctica, el periodo de tiempo puede ser incluso más largo. La dosis se determinará por la eficacia del agente activo particular y el estado del animal (por ejemplo, ser humano), así como el peso corporal del animal (por ejemplo, ser humano) que va a tratarse.

En la materia se conocen muchos ensayos para determinar una dosis administrada. En el contexto de la presente memoria, un ensayo, que comprende comparar el grado al que se trata el cáncer tras la administración de una dosis dada del agente activo de la presente divulgación a un mamífero entre un conjunto de mamíferos, a cada conjunto de los cuales se le administra una dosis diferente del agente activo, puede utilizarse para determinar la dosis inicial que va a administrarse a un mamífero. El grado al que se trata el cáncer tras la administración de una determinada dosis puede representarse, por ejemplo, mediante el grado de regresión tumoral alcanzado con el agente activo en un modelo de xenoinjerto de ratón. En la materia se conocen métodos de someter a ensayo la regresión tumoral y se describen en la presente memoria en los ejemplos.

La dosificación del agente activo de la presente divulgación asimismo se determinará por la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de un agente activo particular de la presente divulgación. Normalmente, el médico encargado decidirá la dosificación del agente activo de la presente divulgación con la que tratar a cada paciente individual, teniendo en consideración una variedad de factores, tales como edad, peso corporal, salud general, dieta, sexo, agente activo de la presente divulgación que va a administrarse, vía de administración y la gravedad del estado que está tratándose. A título de ejemplo no limitativo de la presente divulgación, la dosis del agente activo de la presente divulgación puede ser de aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal del sujeto que está tratándose/día, desde aproximadamente 0.0001 hasta aproximadamente 0.001 g/kg de peso corporal/día, o de aproximadamente 0.01 mg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal/día.

Formulaciones de liberación controlada

En algunas puestas en práctica, los agentes activos descritos en la presente memoria pueden modificarse para dar una forma de depósito, de tal modo que la manera en la que se libera el agente activo de la presente divulgación al interior del cuerpo al que se administra se controla con respecto al tiempo y la ubicación dentro del cuerpo (véase, por ejemplo, la patente US nº 4.450.150). Las formas de depósito de agentes activos de la presente divulgación pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprende los agentes activos y un material poroso o no poroso, tal como un polímero, en las que el agente activo está encapsulado por o se difunde a través del material y/o la degradación del material no poroso. Entonces se implanta el depósito en la ubicación deseada dentro del cuerpo del sujeto y el agente activo se libera a partir del implante a una tasa predeterminada.

En determinados aspectos, la composición farmacéutica que comprende el agente activo se modifica para presentar cualquier tipo de perfil de liberación *in vivo*. En algunos aspectos, la composición farmacéutica es una formulación de liberación inmediata, liberación controlada, liberación sostenida, liberación prolongada, liberación retardada o liberación bifásica. En la materia se conocen métodos de formulación de péptidos para liberación controlada. Ver, por ejemplo, Qian *et al.*, *J Pharm* 374: 46-52 (2009) y las publicaciones de solicitud de patente internacional WO 2008/130158, WO2004/033036; WO2000/032218; y WO 1999/040942.

Las presentes composiciones pueden comprender además, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en una forma de liberación prolongada para proporcionar un efecto de almacenamiento y/o administración prolongado.

Utilización

Las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación son útiles para inhibir el crecimiento tumoral. Sin limitarse a ninguna teoría particular, la acción de inhibición de las proteínas de unión a antígeno proporcionadas en la presente memoria permite que tales entidades sean útiles en métodos de tratamiento de cáncer.

Por lo tanto, en la presente memoria se proporcionan métodos de inhibición del crecimiento tumoral en un sujeto y métodos de reducción del tamaño tumoral en un sujeto. En diversas puestas en práctica, los métodos comprenden administrar al sujeto la composición farmacéutica de la presente divulgación en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento tumoral o reducir el tamaño tumoral en el sujeto. En diversos aspectos, se inhibe el crecimiento de un tumor de ovarios, tumor de melanoma, tumor de vejiga o tumor endometrial. En diversos aspectos, se reduce el tamaño de un tumor de ovarios, tumor de melanoma, de vejiga o tumor endometrial.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "inhibir" o "reducir" y términos derivados de los mismos pueden no ser una inhibición o reducción de 100 % o completa. En vez de eso, existen grados variables de inhibición o reducción de los cuales un experto ordinario en la materia reconoce que presentan un posible beneficio o efecto terapéutico. Con respecto a esto, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación pueden inhibir el crecimiento tumoral o reducir el tamaño tumoral hasta cualquier cantidad o nivel. En diversas puestas en práctica, la inhibición proporcionada por los métodos de la presente divulgación es una inhibición de por lo menos o aproximadamente a 10 % (por ejemplo, una inhibición de por lo menos o aproximadamente 20 %, una inhibición de por lo menos o aproximadamente 30 %, una inhibición de por lo menos o aproximadamente 40 %, una inhibición de por lo menos o aproximadamente 50 %, una inhibición de por lo menos o aproximadamente 60 %, una inhibición de por lo menos o aproximadamente 70 %, una inhibición de por lo menos o aproximadamente 80 %, una inhibición de por lo menos o aproximadamente 90 %, una inhibición de por lo menos o aproximadamente 95 %, una inhibición de por lo menos o aproximadamente el 98 %). En diversas puestas en práctica, la reducción proporcionada por los métodos de la presente divulgación es una reducción de por lo menos o aproximadamente 10 % (por ejemplo, una reducción de por lo menos o aproximadamente 20 %, una reducción de por lo menos o aproximadamente 30 %, una reducción de por lo menos o aproximadamente 40 %, una reducción de por lo menos o aproximadamente 50 %, una reducción de por lo menos o aproximadamente 60 %, una reducción de por lo menos o aproximadamente 70 %, una reducción de por lo menos o aproximadamente 80 %, una reducción de por lo menos o aproximadamente 90 %, una reducción de por lo menos o aproximadamente 95 %, una reducción de por lo menos o aproximadamente el 98 %).

Adicionalmente, en la presente memoria se proporcionan métodos de tratamiento de un sujeto con cáncer, por ejemplo, cáncer que expresa CLDN6. En diversas puestas en práctica, el método comprende administrar al sujeto la composición farmacéutica de la presente divulgación en una cantidad eficaz para tratar el cáncer en el sujeto.

En el contexto de la presente memoria, el cáncer de los métodos divulgados en la presente memoria puede ser cualquier cáncer, por ejemplo, cualquier crecimiento o tumor maligno provocado por división celular anómala y descontrolada que puede diseminarse a otras partes del cuerpo a través del sistema linfático o el torrente sanguíneo. En algunos aspectos, el cáncer es uno seleccionado de entre el grupo que consiste en cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rabdomiosarcoma alveolar, cáncer óseo, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer de ano, canal anal, o anorrecto, cáncer ocular, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer de cuello, vesícula biliar, o pleura, cáncer de nariz, cavidad nasal, u oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cuello uterino, tumor carcinoide gastrointestinal, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de ovarios, cáncer pancreático, peritoneo, epiplón, y cáncer mesentérico, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales (RCC)), cáncer de intestino delgado, cáncer de tejido blando, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de uréter, y cáncer de vejiga urinaria. En aspectos particulares, el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste en: cánceres de cabeza y cuello, de ovarios, de cuello uterino, de vejiga y de esófago, cáncer pancreático, gastrointestinal, cánceres gástricos, de mama, endometrial y colorrectal, carcinoma hepatocelular, glioblastoma, vejiga, cáncer de pulmón, por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), carcinoma bronquioloalveolar. En diversos aspectos, el cáncer es cáncer de ovarios, melanoma, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer endometrial. En diversos aspectos, el cáncer es cualquier cáncer caracterizado por una expresión de moderada a alta de CLDN6. Ver, por ejemplo, de la figura 1 a la figura 3. En diversos aspectos, el cáncer es leucemia mieloide aguda, linfoma de células B grandes, cáncer de estómago, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de hígado, cáncer de mama, carcinoma de riñón de células claras, cáncer de cabeza y cuello, sarcoma, cáncer cromóforo de riñón, glioma de grado inferior, cáncer corticosuprarrenal, glioblastoma, carcinoma de riñón de células papilares, carcinoma de pulmón de células escamosas, cáncer de tiroides, adenocarcinoma de pulmón, cáncer pancreático, cáncer endometrial, carcinosarcoma uterino o cáncer de ovarios. En diversos aspectos, el cáncer se selecciona de entre cáncer de ovarios, cáncer endometrial, cáncer uterino, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas (HNSCC), cáncer de cuello uterino, y vejiga.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tratar", así como términos relacionados con el mismo, no implican necesariamente un tratamiento de 100 % o completo. En vez de eso, existen unos grados variables de tratamiento de los cuales un experto ordinario en la materia reconoce que presentan un posible beneficio o efecto terapéutico. Con respecto a esto, los métodos de tratamiento de cáncer de la presente divulgación pueden proporcionar cualquier cantidad o cualquier nivel de tratamiento. Además, el tratamiento proporcionado por el

método de la presente divulgación puede incluir tratamiento de uno o más estados o síntomas o signos del cáncer que está tratándose. Además, el tratamiento proporcionado por los métodos de la presente divulgación puede comprender ralentizar la progresión del cáncer. Por ejemplo, los métodos pueden tratar cáncer gracias a potenciar la actividad de células T o una respuesta inmunitaria frente al cáncer, reducir el crecimiento del tumor o cáncer, reducir la metástasis de células tumorales, aumentar la muerte celular de células tumorales o cancerosas y similares. En diversos aspectos, los métodos tratan mediante retraso de la aparición o recidiva del cáncer en por lo menos 1 día, 2 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días, 15 días, 30 días, dos meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 4 años o más. En diversos aspectos, los métodos tratan mediante aumento de la supervivencia del sujeto.

Las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación asimismo pueden utilizarse para detectar CLDN6 en una muestra o diagnosticar un cáncer positivo para CLDN6. Por tanto, la presente divulgación proporciona métodos de detección de claudina 6 (CLDN6) en una muestra. En diversas puestas en práctica, el método comprende poner en contacto la muestra con una proteína de unión a antígeno, un conjugado o una proteína de fusión, tal como se describe en la presente memoria, y someter a ensayo para detectar un inmunocomplejo que comprende la proteína de unión a antígeno, conjugado o proteína de fusión unido a CLDN6. La presente divulgación asimismo proporciona métodos de diagnóstico de un cáncer positivo para claudina 6 (CLDN6) en un sujeto. En diversas puestas en práctica, el método comprende poner en contacto una muestra biológica que comprende células o tejido obtenida a partir del sujeto con una proteína de unión a antígeno, un conjugado o una proteína de fusión, tal como se describe en la presente memoria, y someter a ensayo para detectar un inmunocomplejo que comprende la proteína de unión a antígeno, conjugado o proteína de fusión unido a CLDN6.

Sujetos

En algunas puestas en práctica de la presente divulgación, el sujeto es un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, mamíferos del orden *Rodentia*, tales como ratones y hámsteres, y mamíferos del orden *Lagomorpha*, tales como conejos, mamíferos del orden *Carnivora*, incluyendo felinos (gatos) y caninos (perros), mamíferos del orden *Artiodactyla*, incluyendo bovinos (vacas) y porcinos (cerdos) o del orden *Perssodactyla*, incluyendo equinos (caballos). En algunos aspectos, los mamíferos son del orden *Primates*, *Ceboids* o *Simoids* (monos) o del orden *Anthropoids* (seres humanos y simios). En algunos aspectos, el mamífero es un ser humano.

Kits

En algunas puestas en práctica, las proteínas de unión a antígeno de la presente divulgación se proporcionan en un kit. En diversos aspectos, el kit comprende la(s) proteína(s) de unión a antígeno como dosis unitaria. En el contexto de la presente memoria, "dosis unitaria" se refiere a una cantidad diferenciada dispersada en un portador adecuado. En diversos aspectos, la dosis unitaria es la cantidad suficiente para proporcionar a un sujeto un efecto deseado, por ejemplo, inhibición de crecimiento tumoral, reducción de tamaño tumoral, tratamiento de cáncer. Por lo tanto, en la presente memoria se proporcionan kits que comprenden una proteína de unión a antígeno de la presente divulgación opcionalmente proporcionada en dosis unitarias. En diversos aspectos, el kit comprende varias dosis unitarias, por ejemplo, un suministro de dosis unitarias para una semana o un mes, opcionalmente, cada una de las cuales está envasada de manera individual o separada de otro modo de las otras dosis unitarias. En algunas puestas en práctica, los componentes del kit/dosis unitaria están envasados con instrucciones para administración a un paciente. En algunas puestas en práctica, el kit comprende uno o más dispositivos para la administración a un paciente, por ejemplo, una aguja y jeringa y similares. En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno de la presente divulgación, una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, un conjugado que comprende la proteína de unión a antígeno, o un multímero o dímero que comprende la proteína de unión a antígeno, se envasa previamente en una forma lista para utilizar, por ejemplo, una jeringa, una bolsa intravenosa, etc. En algunos aspectos, el kit comprende además otros agentes terapéuticos o de diagnóstico o portadores farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, disolventes, tampones, diluyentes, etc.), incluyendo cualquiera de los descritos en la presente memoria. En aspectos particulares, el kit comprende una proteína de unión a antígeno de la presente divulgación, junto con un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, utilizado en quimioterapia o terapia de radiación.

Diversas puestas en práctica

En diversas puestas en práctica de la presente divulgación, la proteína de unión a antígeno se une a una proteína claudina 6 (CLDN6) humana (SEC ID nº: 200), en la que (a) la proteína de unión a antígeno se une al bucle extracelular 2 (EL2) de un dominio extracelular (ECD) de CLDN6 y no se une al bucle extracelular 1 (EL1) del ECD de CLDN6; o (b) no se une a ninguna de claudina 3 (CLDN3), claudina 4 (CLDN4) y claudina 9 (CLDN9) e inhibe la unión de un anticuerpo de referencia a CLDN6 expresada de manera endógena por células OVCA429 con menos de aproximadamente 1200 nM; o (c) una combinación de las mismas. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno se une a un epítipo dentro de la secuencia de aminoácidos de WTAHAIIRDFYNPLVAEAQKREL (SEC ID nº: 2), o se une a la secuencia de aminoácidos de TAHAIIRDFYNPL (SEC ID nº: 3) o LVAEAQKREL (SEC ID nº: 4) de CLDN 6. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno no se une a una o más de claudina 3 (CLDN3), claudina 4 (CLDN4) y claudina 9 (CLDN9). En diversos casos, la proteína de unión a antígeno no se une

a CLDN3. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno se une a CLDN6, CLDN4 y CLDN9 pero no se une a CLDN3. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno se une a CLDN6 y CLDN4 pero no se une a CLDN3 o CLDN9. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno se une a CLDN6 y CLDN9 pero no se une a CLDN3 o CLDN4.

En diversos casos, la proteína de unión a antígeno de la presente divulgación inhibe la unión de un anticuerpo de referencia a CLDN6 expresada de manera endógena por células OVCA429 con menos de aproximadamente 1200 nM y el anticuerpo de referencia comprende una secuencia variable de cadena ligera de SEC ID nº: 181 y una secuencia variable de cadena pesada de SEC ID nº: 182 o una secuencia variable de cadena ligera de SEC ID nº: 185 y una secuencia variable de cadena pesada de SEC ID nº: 186. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno de la presente divulgación inhibe la unión de un anticuerpo de referencia a CLDN6 expresada de manera endógena por células OVCA429 con menos de aproximadamente 1000 nM o menos de 750 nM (por ejemplo, menos de aproximadamente 500 nM, menos de aproximadamente 250 nM, menos de aproximadamente 100 nM) y el anticuerpo de referencia comprende una secuencia variable de cadena ligera de SEC ID nº: 181 y una secuencia variable de cadena pesada de SEC ID nº: 182 o una secuencia variable de cadena ligera de SEC ID nº: 185 y una secuencia variable de cadena pesada de SEC ID nº: 186.

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende (a) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada expuesta en la tabla A o A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 11, 17, 23, 29, 35, 41, 47, 53, 59, 65, 71, 77, 83, 89, 95, 101, 107, 113, 119, 125, 131, 452, 455, 461, 465 y 472, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %) de identidad de secuencia; (b) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada expuesta en la tabla A o A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 86, 102, 108, 114, 120, 126, 132, 475, 456, 462, 466, 468 y 473, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %) de identidad de secuencia; (c) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada expuesta en la tabla A o A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 13, 19, 25, 31, 37, 43, 49, 55, 61, 67, 73, 79, 85, 91, 97, 103, 109, 115, 121, 127, 133, 453, 457, 463, 467, 469 y 474, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %) de identidad de secuencia; (d) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera expuesta en la tabla A o A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 8, 14, 20, 32, 38, 44, 50, 56, 62, 68, 74, 80, 86, 92, 98, 104, 110, 116, 122, 128, 449, 476, 458, 464 y 470, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %) de identidad de secuencia; (e) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera expuesta en la tabla A o A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 9, 15, 21, 27, 33, 39, 45, 51, 57, 63, 69, 75, 81, 87, 93, 99, 105, 111, 117, 123, 129, 450, 477, 459 y 471, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %) de identidad de secuencia; (f) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera expuesta en la tabla A o A1 o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 10, 16, 22, 28, 34, 40, 46, 52, 58, 64, 70, 76, 82, 88, 94, 100, 106, 112, 118, 124, 130, 451, 454 y 460, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %) de identidad de secuencia; (g) una combinación de dos o más cualesquiera de (a)-(f).

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera, una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera, y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera expuestas en la tabla A o A1 y 1 o 2 de las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada expuestas en la tabla A o A1. En algunos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada, una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada, y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada expuestas en la tabla A o A1 y 1 o 2 de las secuencias de aminoácidos de CDR de cadena ligera expuestas en la tabla A o A1. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende seis secuencias de aminoácidos de CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID nº: 74-79; (b) SEC ID nº: 50-55; (c) SEC ID nº: 122-127; (d) SEC ID nº: 26-31; (e) SEC ID nº: 128-133; (f) SEC ID nº: 38-43; (g) SEC ID nº: 62-67; (h) SEC ID nº: 80-85; (i) SEC ID nº: 44-49; (j) SEC ID nº: 86-91; (k) SEC ID nº: 104-109; (l) SEC ID nº: 56-61; (m) SEC ID nº: 32-37; (n) SEC ID nº: 110-115; (o) SEC ID nº: 98-103; (p) SEC ID nº: 92-97; (q) SEC ID nº: 116-121; (r) SEC ID nº: 8-13; (t) SEC ID nº: 68-73; (u) SEC ID nº: 14-19; (v) SEC ID nº: 20-25, (v) SEC ID nº: 449-453 y 475; (w) SEC ID nº: 476-477, 454-457, (x) SEC ID nº: 458-463; (y) SEC ID nº: 57, 58, 464-467; (z) SEC ID nº: 68-71 y 468-469; y (aa) SEC ID nº: 112 y 470-474. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada expuesta en la tabla B o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173 y 175, o una secuencia de variante de

la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %) de identidad de secuencia; o (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera expuesta en la tabla B o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174 y 176, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % (por ejemplo, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 %) de identidad de secuencia; o tanto (a) como (b). En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende un par de secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en: (a) SEC ID nº: 156 y 157; (b) SEC ID nº: 148 y 149; (c) SEC ID nº: 172 y 173; (d) SEC ID nº: 140 y 141; (e) SEC ID nº: 174 y 175; (f) SEC ID nº: 144 y 145; (g) SEC ID nº: 152 y 153; (h) SEC ID nº: 158 y 159; (i) SEC ID nº: 146 y 147; (j) SEC ID nº: 160 y 161; (k) SEC ID nº: 166 y 167; (l) SEC ID nº: 150 y 151; (m) SEC ID nº: 142 y 143; (n) SEC ID nº: 168 y 169; (o) SEC ID nº: 164 y 165; (p) SEC ID nº: 162 y 163; (q) SEC ID nº: 170 y 171; (r) SEC ID nº: 134 y 135; (s) SEC ID nº: 154 y 155; (t) SEC ID nº: 136 y 137; y (u) SEC ID nº: 138 y 139.

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada expuesta en la tabla B1 o C o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 376-379, 384-387, 391-396, 403-408, 412, 413, 416-419, 422-427, 478, 480, 482, 484, 486 y 488 o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % de identidad de secuencia; o (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera expuesta en la tabla B1 o C o una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 380-383, 388-390, 397-402, 409-411, 414, 415, 420, 421 y 479, 481, 483, 485, 487 y 489 o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 %, o aproximadamente 80 %, o aproximadamente 90 %, o aproximadamente 95 % de identidad de secuencia; o (c) tanto (a) como (b). En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno comprende un par de secuencias de aminoácidos tal como se indican en la tabla D.

La presente divulgación proporciona una proteína de unión a antígeno que comprende: (A) una CDR1 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de YTFTXYT, en la que X es T, V, D o S (SEC ID nº: 452), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de YTFTTYT (SEC ID nº: 11); (B) una CDR2 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de IXPSSGYT, en la que X es Q, S, A o N (SEC ID nº: 475), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de INPSSGYT (SEC ID nº: 12); (C) una CDR3 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de AXGDYYVAY, en la que X es N, Q, H o D (SEC ID nº: 453), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de ANGDIYYVAY (SEC ID nº: 13); (D) una CDR1 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SSVSSXY, en la que X es T, V, F o D (SEC ID nº: 449), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de SSVSSTY (SEC ID nº: 8); (E) una CDR2 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de XTX, en la que X en la posición 1 es S, T, Q o A y X en la posición 3 es S, T, D o Q (SEC ID nº: 450), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de STS (SEC ID nº: 9); y (F) una CDR3 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de HXYXRSPLT, en la que X en la posición 2 es Q, H o S y X en la posición 4 es H, Y, Q o S (SEC ID nº: 451), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de HQYHRSPLT (SEC ID nº: 10).

Una proteína de unión a antígeno que comprende: (A) una CDR1 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de FTFSXYX, en la que X en la posición 5 es N, S, R, Q o A y X en la posición 7 es W, H, Y, F (SEC ID nº: 455), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de FTFSNYW (SEC ID nº: 23); (B) una CDR2 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de IRLKXDXYAT, en la que X en la posición 5 es S, N, A o T y X en la posición 7 es Q, S, A, N (SEC ID nº: 456), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de IRLKSDNYAT (SEC ID nº: 24); (C) una CDR3 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de XDGPPSGX, en la que X en la posición 1 es N, D o T y X en la posición 8 es S, T, A, C o Y (SEC ID nº: 457), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de NDGPPSGC (SEC ID nº: 25); (D) una CDR1 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de EXIYSY, en la que X es Q, S, A, D o N (SEC ID nº: 476), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de ENIYSY (SEC ID nº: 20); (E) una CDR2 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de XAK, en la que X en la posición 1 es Q, S, A, D o N (SEC ID nº: 477), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de NAK (SEC ID nº: 21); y (F) una CDR3 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de QXHYXVPWT, en la que X en la posición 2 es H, Q, S o T y X en la posición 5 es T, S, N o G (SEC ID nº: 454), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de QHHYTVPWT (SEC ID nº: 22).

Una proteína de unión a antígeno que comprende: (A) una CDR1 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de YTXTXYT, en la que X en la posición 3 es F, Y, S o T y X en la posición 5 es S, T, Y o D (SEC ID nº: 461), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de YTFTSYT (SEC ID nº: 29); (B) una CDR2 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de IXPSSXYT, en la que X en la posición 2 es Q, S, A o N y X en la posición 6 es T, S, V, D o G (SEC ID nº: 462), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de INPSSTYT (SEC ID nº: 30); (C) una CDR3 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de XRGEXGGFAY, en la que X en la posición 1 es S, A, T o V y X en la posición 5 es L, V o F (SEC ID nº: 463),

opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de SRGELGGFAY (SEC ID nº: 31); (D) una CDR1 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de QSLVHSXGXTY, en la que X en la posición 7 es D, N, E, Q, S o A y X en la posición 9 es Q, S, A, D o N (SEC ID nº: 458), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de QSLVHSDGNTY (SEC ID nº: 26); (E) una CDR2 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de XVX, en la que X en la posición 1 es K, Q o R y X en la posición 3 es S, T o V (SEC ID nº: 459), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de KVS (SEC ID nº: 27); y (F) una CDR3 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de SXXTHVPYT, en la que X en la posición 2 es Q, H o T y X en la posición 3 es S, G, T o D (SEC ID nº: 460), opcionalmente, que comprende la secuencia de aminoácidos de SQSTHVPYT (SEC ID nº: 28).

En diversas puestas en práctica, la proteína de unión a antígeno comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de: SEC ID nº: 504 o SEC ID nº: 507, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia;
- (b) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de: SEC ID nº: 505 o SEC ID nº: 508, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia;
- (c) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de: SEC ID nº: 506 o SEC ID nº: 509, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia;
- (d) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de: SEC ID nº: 449 o SEC ID nº: 476, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia;
- (e) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de: SEC ID nº: 450 o SEC ID nº: 477, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia;
- (f) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de: SEC ID nº: 451 o SEC ID nº: 454, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia;
- (g) una combinación de dos o más cualesquiera de (a)-(f).

Opcionalmente, la secuencia de variante presenta por lo menos aproximadamente 80 %, por lo menos o aproximadamente 85 %, por lo menos o aproximadamente 90 % o por lo menos o aproximadamente 95 % de identidad de secuencia.

En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de SEC ID nº: 449, una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera o SEC ID nº: 450, y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera o SEC ID nº: 451 y una o dos de una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de SEC ID nº: 504, una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada o SEC ID nº: 505, y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada o SEC ID nº: 506. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de SEC ID nº: 476, una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera o SEC ID nº: 477, y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera o SEC ID nº: 454 y una o dos de una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de SEC ID nº: 507, una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada o SEC ID nº: 508, y una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada o SEC ID nº: 509. Opcionalmente, la proteína de unión a antígeno comprende seis secuencias de aminoácidos de CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 449-451 y 504-506; y SEC ID nº: 476, 477, 454 y 507-509.

En aspectos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende: (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de una cualquiera de SEC ID nº: 490-503, o una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada etiquetada como S1-S12 en la figura 22, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia; o (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de una cualquiera de SEC ID nº: 380-383, 388-390, 479 y 481, o una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera etiquetada como S1-S12 en la figura 22, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia; o (c) tanto (a) como (b). En algunos aspectos, la secuencia de variante presenta por lo menos aproximadamente 80 % o por lo menos o aproximadamente 85 % de identidad de secuencia, o la secuencia de

variante presenta por lo menos aproximadamente 90 % o por lo menos aproximadamente 95 % de identidad de secuencia.

En casos ejemplificativos, la proteína de unión a antígeno comprende un par de secuencias de aminoácidos:

SEC ID nº: 389 y 490;
SEC ID nº: 389 y 491;
SEC ID nº: 389 y 492;
SEC ID nº: 389 y 493;
SEC ID nº: 389 y 494;
SEC ID nº: 389 y 495;
SEC ID nº: 383 y 496;
SEC ID nº: 383 y 497;
SEC ID nº: 383 y 498;
SEC ID nº: 383 y 499;
SEC ID nº: 383 y 500;
SEC ID nº: 383 y 501;
SEC ID nº: 383 y 503;
SEC ID nº: 389 y 502;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S1 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S1 en la figura 22;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S2 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S2 en la figura 22;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S3 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S3 en la figura 22;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S4 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S4 en la figura 22;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S5 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S5 en la figura 22;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S6 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S6 en la figura 22;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S7 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S7 en la figura 22;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S78 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S8 en la figura 22;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S89 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S9 en la figura 22;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S910 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S10 en la figura 22;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S11 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S11 en la figura 22; o

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S12 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S12 en la figura 22.

En algunos aspectos, la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo, por ejemplo, anticuerpo monoclonal. En diversos aspectos, anticuerpo es una IgG. Opcionalmente, la proteína de unión a antígeno inhibe por lo menos aproximadamente 50 % del crecimiento de colonias en un ensayo de proliferación en 3D en agar blando, inhibe el crecimiento tumoral en ratones con xenoinjerto a los que se les inyectaron células cancerosas humanas, inhibe el crecimiento tumoral en ratones con xenoinjerto a los que se les inyectaron células de cáncer de ovarios, células cancerosas de melanoma, células de cáncer de vejiga o células de cáncer endometrial, o inhibe por lo menos 50 % del crecimiento tumoral en ratones con xenoinjerto a los que se les inyectaron células de cáncer de ovarios, células de cáncer de vejiga o células de cáncer endometrial.

Por lo tanto, en las diversas puestas en práctica, la presente divulgación proporciona una proteína de unión a

antígeno que comprende

- (a) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena pesada de: SEC ID nº: 504 o SEC ID nº: 507, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia;
- (b) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena pesada de: SEC ID nº: 505 o SEC ID nº: 508, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia;
- (c) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena pesada de: SEC ID nº: 506 o SEC ID nº: 509, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia;
- (d) una secuencia de aminoácidos de CDR1 de cadena ligera de: SEC ID nº: 449 o SEC ID nº: 476, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia;
- (e) una secuencia de aminoácidos de CDR2 de cadena ligera de: SEC ID nº: 450 o SEC ID nº: 477, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia;
- (f) una secuencia de aminoácidos de CDR3 de cadena ligera de: SEC ID nº: 451 o SEC ID nº: 454, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia; o
- (g) una combinación de dos o más cualesquiera de (a)-(f).

Asimismo se proporciona una proteína de unión a antígeno que comprende seis secuencias de aminoácidos de CDR seleccionadas de entre el grupo que consiste en: SEC ID nº: 449-451 y 504-506; y SEC ID nº: 476, 477, 454 y 507-509.

La presente divulgación proporciona una proteína de unión a antígeno que comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de una cualquiera de SEC ID nº: 490-503, o una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada etiquetada como S1-S12 en la figura 22, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia; o
- (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de una cualquiera de SEC ID nº: 380-383, 388-390, 479 y 481, o una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera etiquetada como S1-S12 en la figura 22, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia; o
- (c) tanto (a) como (b).

En diversos aspectos, la secuencia de variante presenta por lo menos aproximadamente 85 % de identidad de secuencia o aproximadamente 90 % o aproximadamente 95 % de identidad de secuencia.

La presente divulgación asimismo proporciona una proteína de unión a antígeno que comprende un par de secuencias de aminoácidos seleccionadas de entre el grupo que consiste en:

SEC ID nº: 389 y 490;
 SEC ID nº: 389 y 491;
 SEC ID nº: 389 y 492;
 SEC ID nº: 389 y 493;
 SEC ID nº: 389 y 494;
 SEC ID nº: 389 y 495;
 SEC ID nº: 383 y 496;
 SEC ID nº: 383 y 497;
 SEC ID nº: 383 y 498;
 SEC ID nº: 383 y 499;
 SEC ID nº: 383 y 500;
 SEC ID nº: 383 y 501;
 SEC ID nº: 383 y 503;
 SEC ID nº: 389 y 502;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S1 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S1 en la figura 22;

5 la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S2 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S2 en la figura 22;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S3 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S3 en la figura 22;

10 la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S4 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S4 en la figura 22;

15 la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S5 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S5 en la figura 22;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S6 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S6 en la figura 22;

20 la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S7 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S7 en la figura 22;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S78 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S8 en la figura 22;

25 la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S89 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S9 en la figura 22;

30 la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S910 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S10 en la figura 22;

la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S11 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S11 en la figura 22; o

35 la secuencia de región variable de cadena pesada etiquetada como S12 en la figura 22 y la secuencia de región variable de cadena ligera etiquetada como S12 en la figura 22.

En la presente memoria se proporciona una proteína de unión a antígeno que comprende:

40 (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada expuesta como SEC ID n°: 510 o 513 o en la figura 23 o la figura 25, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia; o

45 (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera expuesta como SEC ID n°: 511 o 512 o en la figura 24 o la figura 26, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en uno o dos aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia; o

(c) tanto (a) como (b).

50 La presente divulgación asimismo proporciona una proteína de unión a antígeno que comprende un par de secuencias de aminoácidos en la que el par comprende

55 (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada expuesta como SEC ID n°: 510 y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera expuesta como SEC ID n°: 511, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en 1-5 aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia; opcionalmente, en la que los 1-5 aminoácidos que difieren son tal como se muestran en la figura 23 para la cadena pesada o la figura 24 para la cadena ligera, o

60 (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada expuesta como SEC ID n°: 513 y una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera expuesta como SEC ID n°: 512, o una secuencia de variante de la misma que difiere únicamente en 1-5 aminoácidos o que presenta por lo menos o aproximadamente 70 % de identidad de secuencia; u opcionalmente, en la que los 1-5 aminoácidos que difieren son tal como se muestran en la figura 25 para la cadena pesada o la figura 26 para la cadena ligera.

65 En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno divulgada en la presente memoria comprende un polipéptido

de Fc que comprende un glicano afucosilado.

En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno de la presente divulgación es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno es una IgG. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno inhibe por lo menos aproximadamente 50 % del crecimiento de colonias en un ensayo de proliferación en 3D en agar blando o inhibe el crecimiento tumoral en ratones con xenoinjerto a los que se les inyectaron células cancerosas humanas. En diversos aspectos, la proteína de unión a antígeno inhibe el crecimiento tumoral en ratones con xenoinjerto a los que se les inyectaron células de cáncer de ovarios, células cancerosas de melanoma, células de cáncer de vejiga o células de cáncer endometrial. En diversos casos, la proteína de unión a antígeno inhibe por lo menos 50 % del crecimiento tumoral en ratones con xenoinjerto a los que se les inyectaron células de cáncer de ovarios, células de cáncer de vejiga o células de cáncer endometrial.

La presente divulgación proporciona un conjugado que comprende una proteína de unión a antígeno descrita en la presente memoria y un resto heterólogo. En aspectos ejemplificativos, el conjugado comprende un agente citotóxico o un agente quimioterápico, tal como, por ejemplo, cualquiera de los descritos en la presente memoria. En diversos aspectos, el agente quimioterápico es un agente antimitótico que inhibe la división celular bloqueando la polimerización de tubulina. En algunos casos, el agente antimitótico es una auristatina, opcionalmente, MMAE.

La presente divulgación asimismo proporciona una proteína de fusión que comprende una proteína de unión a antígeno descrita en la presente memoria. La presente divulgación proporciona además un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno, un conjugado o una proteína de fusión, de la presente divulgación. La presente divulgación proporciona un vector que comprende el ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno, un conjugado o una proteína de fusión, de la presente divulgación. La presente divulgación proporciona adicionalmente una célula huésped que comprende el ácido nucleico o el vector de la presente divulgación.

La presente divulgación proporciona un método de producción de una proteína de unión a antígeno que se une a una proteína claudina 6 (CLDN6), que comprende (i) cultivar la célula huésped de la presente divulgación en un medio de cultivo celular, en el que la célula huésped comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de unión a antígeno según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, y (ii) recoger la proteína de unión a antígeno a partir del medio de cultivo celular. Además, se proporciona un método de producción de una proteína de fusión que comprende una proteína de unión a antígeno que se une a una proteína claudina 6 (CLDN6), que comprende (i) cultivar la célula huésped de la presente divulgación en un medio de cultivo celular, en el que la célula huésped comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión de la presente divulgación, y (ii) recoger la proteína de fusión a partir del medio de cultivo celular.

La presente divulgación proporciona además un método de producción de una composición farmacéutica que comprende combinar una proteína de unión a antígeno, un conjugado, una proteína de fusión, un ácido nucleico, un vector, una célula huésped, de la presente divulgación, o una combinación de las mismas, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Asimismo se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden proteína de unión a antígeno, un conjugado, una proteína de fusión, un ácido nucleico, un vector, una célula huésped, de la presente divulgación, o una combinación de las mismas, y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En la presente memoria se proporciona, pero no se encuentra dentro del alcance de las reivindicaciones, un método de tratamiento de un sujeto con un cáncer que expresa CLDN6, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en la presente memoria en una cantidad eficaz para tratar el cáncer. Asimismo se proporciona un método de inhibición del crecimiento tumoral en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en la presente memoria en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento tumoral. La presente divulgación proporciona un método de reducción del tamaño tumoral en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en la presente memoria en una cantidad eficaz para reducir el tamaño tumoral. Además se proporciona un método de prevención de la recidiva de cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica descrita en la presente memoria en una cantidad eficaz para prevenir la recidiva de cáncer.

La presente divulgación proporciona un método de detección de claudina 6 (CLDN6) en una muestra, que comprende poner en contacto la muestra con una proteína de unión a antígeno, un conjugado o una proteína de fusión, de la presente divulgación, y someter a ensayo para detectar un inmunocomplejo que comprende la proteína de unión a antígeno, conjugado o proteína de fusión unido a CLDN6. Asimismo se proporciona en la presente memoria un método de diagnóstico de un cáncer positivo para claudina 6 (CLDN6) en un sujeto, que comprende poner en contacto una muestra biológica que comprende células o tejido obtenida a partir del sujeto con una proteína de unión a antígeno, un conjugado o una proteína de fusión, de la presente divulgación, y someter a ensayo para detectar un inmunocomplejo que comprende la proteína de unión a antígeno, conjugado o proteína de fusión unido a CLDN6.

La presente divulgación asimismo proporciona un método de tratamiento de cáncer en un sujeto al que se le ha diagnosticado que presenta baja sobreexpresión de CLDN6, método que no se encuentra dentro del alcance de las reivindicaciones. En diversas puestas en práctica, el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica divulgada en la presente memoria en una cantidad eficaz para prevenir la recidiva de cáncer. En algunos aspectos, la administración induce la apoptosis en células tumorales, opcionalmente, la administración induce la apoptosis en células que expresan CLDN6. En diversos aspectos, el sujeto presenta un tumor y el tumor se clasifica de manera semicuantitativa en uno de cuatro grupos: alta expresión, expresión moderada, baja expresión y sin expresión. En diversos casos, los tumores de alta expresión se definen como ARN de CLDN6 a más de 12 log de fragmentos por millón de kilobases (FPKM), en los que el ARN de CLDN6 se mide mediante RNASeq, o los niveles de proteína CLDN6 son de más de 3+ tal como se mide mediante inmunohistoquímica (IHC). En diversos casos, los tumores de expresión moderada se definen como ARN de CLDN6 a más de 10 log FPKM, en los que el ARN de CLDN6 se mide mediante RNASeq, o los niveles de proteína CLDN6 son de más de 2+ tal como se mide mediante IHC. En diversos casos, los tumores de baja expresión se definen como ARN de CLDN6 a más de 6 log FPKM, en los que el ARN de CLDN6 se mide mediante RNASeq, o los niveles de proteína CLDN6 son de más de 1+ tal como se mide mediante IHC. En diversos casos, los tumores sin expresión se definen como ARN de CLDN6 a menos de 6 log FPKM, en los que el ARN de CLDN6 se mide mediante RNASeq, o los niveles de proteína CLDN6 están por debajo de los límites de detección de IHC. En diversos aspectos, el sujeto que presenta dicho tumor asimismo se describe como que presenta alta expresión, expresión moderada, baja expresión o sin expresión de CLDN6.

Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar la presente divulgación.

Ejemplos

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra un análisis de los niveles de ARN de CLDN6 en diferentes fuentes de células y tejidos.

Con el fin de establecer un nivel inicial para la expresión de CLDN6 en diferentes materiales de origen, se sometieron a ensayo los niveles de expresión de la expresión de CLDN6 en muestras de pacientes, tejido normal y líneas celulares creadas por el Translational Oncology Research Laboratory (TORL).

Se midieron los niveles de ARN de CLDN6 en muestras de paciente utilizando información contenida en la base de datos The Cancer Genome Atlas (TCGA) gestionada por el National Cancer Institute (NCI). Se midieron los niveles de CLDN6 en tejido normal utilizando información en la base de datos Genotype-Tissue Expression (GTEx) gestionada por el Common Fund. El análisis de tejidos de la base de datos GTEx mostró que CLDN6 puede detectarse en diversos sitios, incluyendo el cerebro, glándula pituitaria, páncreas, riñón, pulmón, tiroides y cuello uterino, entre otros tejidos (figura 1).

Se midieron los niveles de expresión de CLDN6 en líneas celulares de cáncer de TORL utilizando micromatrices Agilent 44K (chip de matriz de 4x44K, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y ensayos de secuenciación de ARN (ARN-Seq). Se realizó RNASeq por BGI Americas (Cambridge, MA) utilizando su servicio de "RNASeq para cuantificación". Tal como se muestra en la figura 2 y la figura 3, las células de cáncer de ovarios, cabeza y cuello, pulmón y vejiga expresaron los niveles más altos de CLDN6, aunque los niveles de expresión de CLDN6 fueron detectables en células de cáncer de mama, riñón, colon, sarcoma e hígado.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra la producción de células modificadas por ingeniería para sobreexpresar CLDN6.

Se generaron modelos modificados por ingeniería para sobreexpresar CLDN6. Se utilizaron estos modelos para determinar la eficacia de anticuerpos frente a CLDN6 descritos en el ejemplo 5. En resumen, se modificó por ingeniería una secuencia de nucleótidos que codifica CLDN6 en un vector bicistrónico que tenía un promotor de CMV y un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) atenuado de virus de la encefalomiocarditis (VEMC). El IRES estaba ubicado entre el ADNc del gen de interés (GOI) (CLDN6) y ADNc de puromicina. Un elemento regulador postranscripcional de la marmota (WPRE) estaba ubicado en el sentido de 3' del ADNc de puromicina. El vector asimismo expresaba o bien una secuencia de marcador de GFP o bien una etiqueta de MycDDK. La secuencia del vector de expresión que contiene GFP se proporciona en la presente memoria como SEC ID n°: 189.

El vector de expresión se transdujo de manera viral en células HEK293T (con fines de selección) y células NIH3T3 (para inmunizaciones). Se seleccionaron células transducidas de manera positiva basándose en la supervivencia en medio que contenía puromicina (1 µg/ml). Se subclonaron las células positivas para obtener una población clonal, uniforme y estable de células que sobreexpresaban CLDN6.

Se confirmó la expresión de subclones de CLDN6 mediante citometría de flujo utilizando un anticuerpo monoclonal frente a CLDN6 de referencia (AcM) en un citómetro de flujo BD Biosciences Accuri™ (San Jose, CA). Se utilizó un

anticuerpo secundario y conjugado: anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (reactividad cruzada mínima) con Alexa Fluor® 647 (Biolegend, San Diego, CA; N° de cat. 405322) para detectar la actividad de unión entre el AcM frente a CLDN6 de referencia y la CLDN6 expresada por el subclon.

Se determinó la ubicación celular de CLDN6 mediante microscopía de fluorescencia utilizando el sistema de obtención de imágenes Cellavista® (Synentec (Mountain View, CA) con células que expresaban una proteína de fusión de CLDN6-proteína verde fluorescente (GFP). Tal como se muestra en la figura 4, se detectó la fluorescencia de la GFP en la membrana celular, demostrando que CLDN6 se localiza en la membrana celular.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra la producción de anticuerpos de referencia y de control.

Se produjeron anticuerpos específicos para CLDN6 de comparación (de referencia) y anticuerpos de control clonando las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo en el sistema de expresión ExpiCHO™ (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) para producir anticuerpos quiméricos de IgG2A de ratón recombinantes. Se sometieron estos anticuerpos a prueba junto con anticuerpos específicos para CLDN6 recién generados descritos en el ejemplo 5.

En resumen, se transfectaron plásmidos que contenían las secuencias de anticuerpo de control y de comparación utilizando el sistema de expresión ExpiCHO™ (número de catálogo: A29133, ThermoFisher Scientific, EE. UU.) según el protocolo del fabricante. Se cultivaron las células a 37°C y CO₂ al 8 % en el día 1 y después a 32° C y CO₂ al 5 % tras la transfección en medios proporcionados en el kit. Se purificaron anticuerpos aclarando el medio de cultivo ExpiCHO™ mediante centrifugación a 1,000g durante 10 min seguido por 5,000g durante 30 min. Después se filtró el sobrenadante utilizando un filtro de 0.45 µm seguido por un filtro de 0.22 µm. Posteriormente, se sometió el sobrenadante a purificación por afinidad utilizando resinas de proteína A/G (Life Technologies, Carlsbad, CA; n° de catálogo 20424) según el protocolo del fabricante. Antes de la purificación por ELISA, se determinó de manera aproximada el título de anticuerpo en el medio de cultivo para garantizar que la cantidad de medio cargado ocupaba menos de 80 % de la capacidad de unión de resina. Tras la incubación, se lavaron las resinas con PBS y se eluyeron con tampón de elución (Life Technologies, n° de catálogo 21004). Se ajustaron inmediatamente las fracciones de elución a pH fisiológico añadiendo tampón Tris, pH 8.0. Posteriormente se sometieron los anticuerpos purificados a intercambio de tampón y concentración de proteína utilizando una unidad de filtro centrífuga Amicon Ultra-15 (Life Technologies, n° de catálogo UFC900324) en tampón de PBS. Se determinó la concentración de anticuerpo mediante ensayo de proteínas de BCA. Se llevaron a cabo SDS-PAGE y tinción con Coomassie para someter a prueba la pureza de anticuerpo. SE extrajeron alícuotas de la proteína purificada y se almacenaron a -80°C durante un tiempo de almacenamiento prolongado o se mantuvieron a 4°C para su utilización inmediata.

Se validó la integridad del anticuerpo mediante SDS-PAGE seguido por tinción con Coomassie en condiciones no reductoras frente a reductoras; en condiciones no reductoras se observó una banda dominante a aproximadamente 150 kDa, mientras que en condiciones reductoras se observaron dos bandas a 50 kDa y 25 kDa.

Se produjeron anticuerpos específicos para otros miembros de la familia de CLDN que presentan similitud de secuencia (figura 5), concretamente CLDN3, CLDN4 y CLDN9, esencialmente de la misma manera, excepto porque las secuencias de anticuerpo contenidas en los plásmidos eran secuencias de anticuerpo específicas para CLDN3, CLDN4 o CLDN9.

Ejemplo 4

Este ejemplo demuestra la caracterización de líneas celulares con alta expresión endógena de CLDN6.

Se analizó un panel de líneas celulares de cáncer para determinar su expresión endógena de CLDN6 mediante FACS e inmunotransferencia de tipo Western. En resumen, se validó la unión de anticuerpos a dianas mediante FACS utilizando células que sobreexpresaban CLDN6 (por ejemplo, células HEK293T que sobreexpresaban CLDN6, descritas en el ejemplo 2), y líneas celulares que expresan CLDN6 de manera endógena a niveles altos o bajos, tal como se determinaron en el ejemplo 1. Se incubaron las células que expresaban CLDN6 con anticuerpos de referencia o de control (descritos en el ejemplo 3) durante 30 min sobre hielo, y, después de lavar, se incubaron con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón (reactividad cruzada mínima) conjugado con Alexa Fluor® 647, Biolegend, n° de cat. 405322, durante 30 min sobre hielo. Se leyó la fluorescencia mediante un citómetro de flujo BD Biosciences Accuri™ (San Jose, CA).

Se llevaron a cabo inmunotransferencias western sobre nitrocelulosa con anticuerpos de referencia y de control. En resumen, se sometieron muestras de lisados celulares a ebullición para desnaturar el contenido de proteínas. Se utilizó SDS-PAGE (electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida) para separar las proteínas desnaturizadas mediante la longitud del polipéptido. Después se transfirieron las proteínas separadas a partir del gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa. Se utilizó una disolución de albúmina sérica bovina (BSA) al

2 % para bloquear la membrana, minimizando la unión de anticuerpo no específica. Se incubó la membrana con anticuerpos de referencia o de control. Se tiñó la membrana con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa del rábano (HRP) que reconoce los anticuerpos de referencia o de control y se realizó la detección de anticuerpo secundario mediante quimioluminiscencia.

Se utilizaron las líneas con sobreexpresión para validar los anticuerpos de control y de referencia, y, una vez validados, se utilizaron los anticuerpos de control y de referencia para caracterizar las líneas celulares endógenas. Se incluyeron las células que sobreexpresaban CLDN6 como controles positivos en estos ensayos.

Los ensayos FACS mostraron que cuatro líneas celulares de cáncer de ovarios, además de una línea celular de cáncer endometrial, línea celular de cáncer de vejiga, línea celular de cáncer de pulmón y línea celular de cáncer de tracto GI superior, expresan CLDN6 sobre la superficie a altos niveles. Asimismo se detectaron los altos niveles de expresión de CLDN6 mediante inmunotransferencia western. Se mostró que dos líneas celulares de cáncer de ovarios adicionales, una línea celular de cáncer de hígado adicional, una línea celular de cáncer de pulmón adicional y una línea celular de cáncer de tracto GI superior adicional expresaban CLDN6 hasta un nivel moderado sobre la superficie, tal como se detecta mediante inmunotransferencia de tipo Western. Las células de tumor endometrial y células de tumor de vejiga asimismo expresaban altos niveles de CLDN6 como xenoinjertos *in vivo*. En la tabla 2 se resumen los niveles de expresión endógena de CLDN6 por las líneas celulares de cáncer sometidas a prueba.

Tabla 2

Nombre de línea celular	Histología primaria	RNASeq de CLDN6	Grupo	Expresión en superficie mediante FACS	Expresión de proteína mediante WB (líneas celulares)	Expresión de proteína mediante WB (xeno-injerto)	Tumorígeno, sub Q	Tumorígeno, IP (desnudo)	Tumorígeno, IP (SCID)
OVCA429	Ovario	393.99	Cont. pos.	++++	++++		No	Lento	TBD
ARK2	Endometrial	335.06	Cont. pos.	++++	++++	+++	Sí		
OAW28	Ovario	273.78	Cont. pos.	++++	++++		No	TBD	TBD
UMUC-4	Vejiga	242.93	Cont. pos.	++++	++++	++	Sí	Lento	TBD
PEO14	Ovario	196.63	Cont. pos.	++++	+++		No	TBD	TBD
OV177	Ovario	195.53	Cont. pos.	++++	+		No	TBD	TBD
H1693	Pulmón	184.12	Cont. pos.	++++	+++		TBD		
MKN7	Tracto GI superior	118.6	Cont. pos.	+++	++		TBD		
OV-90	Ovario	108.23	Cont. pos.	++	++	+	Sí		
HUH-7	Hígado	93.52	Cont. pos.	++	+		Sí		
JHOS-4	Ovario	69.3	Cont. pos.	++	+		No	TBD	TBD
H1435	Pulmón	42.8	Cont. pos.	++	+/-		TBD		
NUGC 3	Tracto GI superior	41.11	Cont. pos.	++	++	+	Sí		
RMG-1	Ovario	0.63	Cont. neg.	-	-	-	Sí	TBD	TBD
COLO704	Ovario	0.44	Cont. neg.	-	-	-	Sí	TBD	TBD
MCF-7	Mama	0	Cont. neg.	-	-	-	Sí		
LS513	Colon	0	Cont. neg.	-	-	-	Sí		
M202	Melanoma	0	Cont. neg.	-	-	-	Sí		

M275	Melanoma	0	Cont. neg.	-	-	-	Sí		
KOC-7C	Ovario	0	Cont. neg.	-	-	-	Sí	Sí	TBD

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra la inmunización de ratones para la producción de anticuerpos específicos para CLDN6.

Se produjeron anticuerpos específicos para CLDN6 mediante inmunización de ratones Balb/c y CD1 con una mezcla de tres inmunógenos peptídicos diferentes siguiendo técnicas del Fred Hutchinson Cancer Research Center. Los tres péptidos comprendían el segundo bucle en el dominio extracelular de CLDN6 (es decir, EL2). Los péptidos incluyen la longitud completa de EL2, un péptido que comprende la primera mitad (N-terminal) de EL2, y un péptido que comprende la segunda mitad (C-terminal) de EL2. La tabla 3 proporciona las secuencias de los tres péptidos.

Tabla 3

Inmunógeno peptídico	EL2	SEC ID nº:
Ac-CWTAHAIIRDFYNPLVAEAQKREL-amida	EL2 de longitud completa	2
Ac-CTAHAIIRDFYNPL-amida	Mitad N-terminal	3
Ac-LVAEAQKRELGC-amida	Mitad C-terminal	4

Asimismo se inmunizaron ratones con células 3T3 que sobreexpresaban CLDN6 de longitud completa utilizando un plásmido que comprende un vector de expresión de CLDN6 humana-myc-DDK.

Se recogieron esplenocitos a partir de los ratones inmunizados y se fusionaron con líneas de mieloma mediante electrofusión de BTX (BTX, Holliston, MA) para generar hibridomas. Se generaron 7680 cultivos de hibridomas primarios y se cultivaron en placas de 384 pocillos. Se evaluó la capacidad de los anticuerpos para unirse a péptido mediante matriz de perlas utilizando perlas que expresaban las tres dianas peptídicas diferentes. Volvieron a disponerse en matrices 1920 posibles anticuerpos positivos en placas de 96 pocillos y se seleccionaron adicionalmente mediante citometría de flujo frente a modelos de línea celular endógenos y artificiales.

Después se sometieron a selección inversa los sobrenadantes de hibridomas positivos mediante citometría de flujo frente a modelos endógenos y artificiales de proteínas que presentan similitud de secuencia con respecto a la región diana (por ejemplo, otras proteínas CLDN). A partir de la selección secundaria y la selección inversa, se seleccionaron ~20 anticuerpos específicos para CLDN6 para su estudio adicional. Se subclonaron estos anticuerpos y se determinaron las secuencias de cadena pesada y ligera variables. Ver la tabla B y el listado de secuencias.

Se formatearon anticuerpos frente a CLDN6 como anticuerpos de IgG de longitud completa utilizando expresión de ExpiCHO™. Se clonaron las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos en un vector de expresión de anticuerpo que se modificó por ingeniería en el laboratorio basándose en un vector pcDNA™3.4-TOPO® (número de catálogo: A14697, ThermoFisher Scientific, EE. UU.) y se transfectaron en células CHO según el protocolo proporcionado en el kit (sistema de expresión ExpiCHO™, número de catálogo: A29133, ThermoFisher Scientific, EE. UU.). Se purificaron los anticuerpos y se determinó la unión a superficie celular de los anticuerpos a CLDN6 y la Cl_{50} de anticuerpo mediante FACS en el que se conjugaron anticuerpos frente a CLDN6 directamente con éster de NHS (éster succinimidílico) de Alexa Fluor® 647, nº de cat. A20106 (ThermoFisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. Se sometieron a prueba anticuerpos frente a CLDN6 desde 0.32 nM hasta 1000 nM (dilución en serie de 1:5, 6 puntos) en un volumen de 50 µl con un sistema de 150,000 células.

Se utilizaron células que expresaban CLDN6 en ensayos FACS para determinar la capacidad del anticuerpo frente a CLDN6 para unirse a CLDN6 sobre la superficie de células y para reaccionar de manera cruzada con otros miembros de la familia de CLDN. Se utilizaron células HEK293T modificadas por ingeniería para expresar CLDN6 humana fusionada a GFP, CLDN6 de ratón fusionada a GFP, CLDN9-GFP, CLDN4-GFP, o CLDN3-GFP, o GFP sola (sin CLDN6) como modelos artificiales de expresión de CLDN6. Se utilizaron células ARK2, OVCA429, LS513 y MCF7 como modelos endógenos de expresión de CLDN6, así como modelos para la expresión de CLDN3/4.

Para cada tipo de célula sometido a prueba y para cada AcM, se desprendieron células a partir de la superficie de los matraces de cultivo mediante EDTA (en lugar de tripsina) con el fin de proteger las proteínas de superficie celular. Después se incubaron las células desprendidas con AcM frente a CLDN6 marcados con Alexa Fluor® durante 30 min en la oscuridad sobre hielo a una concentración predeterminada. Se marcaron directamente los AcM frente a CLDN6 con éster de NHS (éster succinimidílico) de Alexa Fluor® 647. Después de lavar, se leyeron las células mediante un citómetro de flujo BD Accuri™ C6 para detectar la unión de anticuerpo-proteína de antígeno en el canal FL4H. Se sometió cada anticuerpo a prueba a concentraciones variables para establecer una curva de

dosis-fluorescencia. Se calculó la CE_{50}/CI_{50} de los anticuerpos (la concentración del anticuerpo a la mitad del valor máximo) basándose en los valores de FL4H (regulado en células individuales viables) utilizando el kit de herramientas Very Simple IC50 Tool Kit disponible en línea que permite representar gráficamente datos biológicos de dosis-respuesta y ajustarlos a tipos de curvas para proporcionar la CE_{50}/CI_{50} . El valor máximo era la concentración más baja del anticuerpo a la que la fluorescencia presenta un máximo. Asimismo se examinaron los anticuerpos para determinar su capacidad para reaccionar de manera cruzada con otras proteínas CLDN tales como CLDN9, CLDN3 y CLDN4. Se utilizaron estos valores para determinar la afinidad relativa de cada anticuerpo entre el conjunto de anticuerpos sometidos a prueba. Se obtuvieron datos de reactividad cruzada utilizando una metodología similar, pero con células que presentaban un perfil de expresión diferente para CLDN6, CLDN3, CLDN4 y CLDN9.

En las tablas 4 y 5 se exponen datos de afinidad relativa y datos de reactividad cruzada tal como se determinan de esta manera.

Tabla 4

Nº de AB	Rango	HEK293T-CLDN6-mGFP	HEK293T-CLDN6-mGFP	HEK293T-CLDN9-mGFP	HEK293T-CLDN4-mGFP	HEK293T-CLDN3-mGFP	HEK293T-mGFP
		CLDN6+ artificial	CLDN6+ artificial (ratón)	CLDN9+ artificial	CLDN4+ artificial	CLDN3+ artificial	Parental
1	1	109	72	2765	5000	5000	5000
2	2	182	5000	5000	5000	5000	5000
3	3	604	2487	5000	5000	5000	5000
4	4	17	5000	1860	739	5000	5000
5	5	10	11	25	5000	5000	5000
6	6	1427	2222	2769	26	5000	5000
7	7	579	1548	1938	2088	5000	5000
8	8	1918	5000	2769	5000	5000	5000
9	9	2671	5000	5000	5000	5000	5000
10	10	2757	5000	246	5000	5000	5000
11	11	1696.29	2375	5000	2238	5000	5000
12	Neg	5000	5000	2468	2087	5000	5000
13	Neg	5000	5000	5000	5000	5000	5000
14	Neg	5000	5000	5000	5000	5000	5000
16	Neg	5000	5000	5000	5000	5000	5000
17	Neg	2,645.95	5000	5000	5000	5000	5000
18	Neg	5000	5000	5000	5000	5000	5000
15	Neg	5000	5000	5000	5000	5000	5000
19	Neg	5000	5000	5000	5000	5000	5000
Ab2 de referencia	0	122	46	5000	5000	5000	5000
Ab1 de referencia	0	57	651	2943	5000	5000	5000

Nº de AB corresponde al nº de AB indicado en las tablas A y B.

TABLA 5

Nº de AB	ARK2	OVCA429	LS513	MCF7
	CLDN6+ endógena	CLDN6+ endógena	CLDN3/4+ endógena	CLDN3/4+ endógena
1	105	84	5000	5000
2	1365	912	5000	5000
3	1653	1096	5000	5000
4	48	168	730	653
5	8	5	781	1485
6	765	394	133	1135
7	353	531	635	979
8	1136	1090	1126	1063
9	1140	1165	1040	5000
10	2143	2473	1947	5000
11	362.81	834.65	492.567	427.031
12	1297	2294	2266	5000

13	1147	2287	1594	5000
14	1304	1661	1161	546
16	5000	5000	5000	5000
17	5000	5000	5000	5000
18	1,354.80	2,435.18	5000	5000
15	5000	5000	5000	5000
19	5000	5000	5000	5000
Ab2 de referencia	1115	1283	2222	5000
Ab1 de referencia	162	62	5000	5000

Nº de AB corresponde al nº de AB indicado en las tablas A y B.

Ejemplo 6

Este ejemplo demuestra la caracterización de AcM de IgG de ratón quiméricos.

Se llevaron a cabo ensayos de proliferación en 3D en agar blando y ensayos de unión de xenoinjerto para caracterizar adicionalmente AcM descritos en el ejemplo 5. En resumen, se sembró en placa una mezcla de capa superior de 250 µl que contenía 10,000 células en agarosa SeaPlaque al 0.6 % en medio 1x RPMI encima de una capa inferior de 250 µl solidificada de agarosa SeaPlaque al 0.6 % en medio 1x RPMI para cada pocillo de una placa de 48 pocillos. Se colocó una capa de alimentación de 250 µl que contenía medio 1x RPMI por encima de la capa superior solidificada. Se prepararon las tres capas del ensayo de agar blando con o sin trastuzumab, AcM frente a CLDN6, o control de IgG2A de ratón empezando a 150 ng/ml (1 µM) y terminando a 1.5 ng/ml, diluyendo 1:10. Cada condición de prueba se realizó por duplicado. Se dejó que las células formaran colonias durante 3 semanas antes de la tinción con rojo neutro al 0.05 %, y se obtuvieron imágenes con el microscopio óptico invertido EVOS XL. Se consideró que las líneas celulares con una disminución ≥ 20 % del número de colonias en la muestra tratada frente a control eran sensibles.

Tal como se muestra en la tabla 6, muchas de líneas celulares mostraron una disminución del número de colonias cuando se trataron con el anticuerpo indicado.

Tabla 6

	Actividad <i>in vitro</i> en 3D
Ab1 de referencia**	70 %
Ab2 de referencia**	50 %
AB1	50 %
AB2	50 %
AB3	50 %
AB4	70 %
AB5	70 %
AB6	70 %
AB7	50 %
AB8	0 %
AB9	0 %
AB10	50 %
AB11	50 %
AB12	0 %
AB13	50 %
AB14	0 %
AB19	50 %
AB16	25 %
AB17	0 %
AB18	0 %
AB19	0 %

Se llevaron a cabo estudios de unión *in vivo* en ratones con xenoinjerto a los que se les inyectaron líneas celulares de cáncer humanas. En resumen, se establecieron modelos de xenoinjerto de líneas celulares de cáncer humanas en ratones desnudos atímicos CD-1 de seis semanas de edad (Charles River Laboratories). Se siguieron las siguientes condiciones para la inyección subcutánea de cada línea celular: ARK2 0.75×10^7 , UMUC4 1.0×10^7 , OV90 1.0×10^7 y M202 0.5×10^7 células, todas con Matrigel al 50 % (BD Biosciences). Se realizaron inyecciones en números suficientes de ratones para obtener 8 ratones por cada rama de tratamiento. Cuando los tumores

alcanzaron un tamaño medio de 150 a 300 mm³, se aleatorizaron los ratones a grupos de tratamiento. Para el tratamiento, se diluyó cada anticuerpo terapéutico (AB3, AB2, Ab1 de referencia, Ab2 de referencia, Ab3 de referencia (trastuzumab) y control de IgG2 no dirigido) en solución salina estéril hasta una concentración de trabajo de 1 mg/ml para inyección intravenosa en la vena de la cola (i.v.). Para el estudio M202, se administró trametinib (solvato de DMSO, MedChem Express) a dosis de 1.0 mg/kg (el 10 % de Cremaphor, el 10 % de PEG400) por v.o. en un calendario de 5 días de tratamiento, 2 días sin tratamiento, durante el primer ciclo semanal, seguido por reducción hasta 0.5 mg/kg durante las dos semanas restantes de administración de dosis. Se midieron los xenoinjertos de tumor con calibres tres veces por semana, y se determinó el volumen tumoral en mm³ multiplicando la altura × anchura × longitud. Se trató a los ratones durante 2-7 semanas. Al final del estudio, se sacrificó a los animales y se escindió el tejido tumoral y se dividió para almacenarse como tejido congelado o incorporado en parafina y fijado con formalina (FFPE) para análisis de biomarcadores. Todo el trabajo con animales se llevó a cabo según un protocolo aprobado por IACUC y la University of California en el Animal Research Committee de Los Ángeles. Se analizaron los datos utilizando el software StudyLog de StudyDirector (San Francisco, CA). Los resultados se presentan como volúmenes medios para cada grupo. Las barras de error representan el error estándar (EE) de la media.

Los resultados de los ensayos de xenoinjerto se muestran en la figura 6 a la figura 10. Tal como se muestra en la figura 6A y la figura 6B, cada uno de AB2 y AB3 provocó un cambio medio sustancial del volumen tumoral en el día 14, con respecto al anticuerpo de IgG2 de control, en ratones portadores de tumores endometriales. Tal como se muestra en la figura 7A y la figura 7B, AB3 provocó un cambio medio sustancial del volumen tumoral en el día 35, con respecto al anticuerpo de IgG2 de control, en ratones portadores de tumores de vejiga. La figura 8A y la figura 8B muestran que cada uno de AB2 y AB3 provocó un cambio medio sustancial del volumen tumoral en el día 20, con respecto al anticuerpo de IgG2 de control, en ratones portadores de tumores de ovarios. La figura 9A y la figura 9B demuestran que AB3 funciona de una manera específica de CLDN, dado que el modelo utilizado en la figura 9A y la figura 9B no expresaba ninguna de CLDN6, CLDN3, CLDN4 y CLDN9 y, por tanto, se utilizó como control negativo. Los datos de la figura 9A y la figura 9B asimismo sugieren que AB3 presenta menos actividad inespecífica que Ab1 de referencia y Ab2 de referencia. La figura 10A resume los resultados de la figura 6 a la figura 9. Tal como se muestra en la figura 10A, AB3 redujo significativamente el crecimiento tumoral en ratones que portaban tumores endometriales, de vejiga y de ovarios, cada uno de los cuales expresa CLDN6, pero no redujo el crecimiento tumoral en ratones portadores de tumores de melanoma, que no expresaban CLDN6 (figura 10B). Tal como se muestra en la figura 11, el cambio medio de peso corporal de ratón durante el tratamiento no cambió sustancialmente, lo que sugiere la seguridad del tratamiento.

Se llevó a cabo un segundo conjunto experimentos en modelos de xenoinjerto de una línea celular de cáncer de ovarios humana, OV90. Se inyectó a los ratones uno de 10 AcM descritos en el ejemplo 5 o un anticuerpo de control (anticuerpo de IgG2A de ratón, Ac frente a CLDN6 de referencia) o un control de vehículo de PBS. Había 8 ratones por grupo y a cada animal se le inyectó por vía intravenosa anticuerpo 10 mg/kg cada 4 días. Tal como se muestra en la figura 12A y la figura 12B, varios anticuerpos descritos en el ejemplo 5 redujeron el volumen tumoral en ratones portadores de tumores de ovarios. Entre los que presentaron mejor rendimiento se encontraban AB3, AB4, AB7 y AB10, aunque todos los anticuerpos sometidos a prueba redujeron el volumen tumoral, con respecto al control de vehículo. Tal como se muestra en la figura 13, el peso corporal de los animales tratados con AB3, AB4, AB7 o AB10 no cambió significativamente, sugiriendo su seguridad.

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra la caracterización adicional de AcM de IgG de ratón quiméricos.

Se llevaron a cabo ensayos de cuantificación de internalización. En resumen, el estudio de internalización de proteína CLDN6 desencadenada por unión a Ab1 de referencia, AB3 o AB4 se realizó con un control positivo, receptor de transferrina (TfR) expresado de manera ubicua que es un receptor de superficie celular conocido que se internaliza tras la unión a anticuerpo.

Se marcaron anticuerpos frente a CLDN6 y TfR con Texas Red™-X, éster succinimidílico, isómeros mixtos, n° de cat. T6134 (ThermoFisher Scientific). Se sembraron células en una cámara μ -Slide de 8 pocillos (n° de cat. 80826, ibidi Cells In Focus Inc.) un día antes del tratamiento con anticuerpo para permitir que las células se unieran y crecieran. Se incubaron las células con anticuerpos marcados durante 30 min en la oscuridad sobre hielo. Después, se leyó la cámara que contenía células marcadas con CLDN6 o TfR mediante microscopio de fluorescencia de laboratorio Echo para recopilar imágenes antes de la internalización. Después se incubó la cámara a 37°C durante 40 min para permitir el proceso de internalización y se recopilaron de nuevo imágenes mediante el microscopio de fluorescencia de laboratorio Echo. AB3 y AB4 provocaron un mayor grado de internalización de CLDN6, en comparación con el provocado por Ab1 de referencia (datos no representados).

Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra la caracterización adicional de AcM de IgG de ratón quiméricos.

Se llevaron a cabo ensayos de proliferación en dos dimensiones (2D) con anticuerpos seleccionados descritos en el ejemplo 5 de la siguiente manera: se sembraron células por duplicado a de 5,000 a 20,000 células por pocillo en una placa de 24 pocillos. Al día siguiente, se trataron células con seis diluciones de 1-5 de AcM (empezando a 100 nM de cualquiera de trastuzumab, AcM frente a CLDN6 o IgG2A de ratón control) y una concentración fija de anticuerpo secundario antirratón conjugado con monometil-auristatina E (MMAE) 1 ng/μl (Moradec, LLC) para generar curvas de dosis-respuesta. Se cuantificaron pocillos de células sin tratar en el día 1, el día de tratamiento con anticuerpo, y después en el día 6 para determinar el intervalo de crecimiento celular. Se cuantificaron los pocillos tratados con AcM en el día 6 y se determinó un crecimiento en cada condición de tratamiento como razón en porcentaje normalizada con respecto al crecimiento de células sin tratar. Se realizó la cuantificación en el contador de partículas Z1 (Beckman Coulter, Inc).

Los resultados se muestran en la figura 14. AB2, AB3, AB4 y AB5 demostraron la mayor eficacia en inhibir la proliferación. La CI_{50} para cada uno de estos anticuerpos fue de entre 0.1 nM y 1 nM. Cada uno de AB7, AB10, AB11 y AB15 asimismo demostró la capacidad para inhibir la proliferación en este ensayo, aunque en menor medida que AB2, AB3, AB4 y AB5.

Ejemplo 9

Este ejemplo demuestra la humanización de anticuerpos de las presentes divulgaciones.

Se seleccionó un subconjunto de anticuerpos indicados en la tabla A para análisis de humanización. Se compararon las secuencias de cadena pesada variable (VH) y de cadena ligera variable (VL) de anticuerpos AB1, AB3, AB4, AB9, AB11 y AB18 con una biblioteca de secuencias de línea germinal humana conocidas de genes de VH humanos y genes de VLkappa humanos (IMGT® the international ImMunoGeneTics information system® www.imgt.org; fundador y director: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, Francia); las bases de datos utilizadas fueron de genes de VH humanos de IMGT (F+ORF, 273 secuencias de línea germinal) y genes de VLkappa humanos de IMGT (F+ORF, 74 secuencias de línea germinal). Se seleccionó la línea germinal humana aceptora de aquellas con una secuencia más próxima al anticuerpo parental.

La tabla 7 proporciona, para cada VH y VL de cada anticuerpo, información sobre las secuencias de línea germinal humanas seleccionadas como secuencia aceptora y la región de unión de cadena pesada humana (gen J) seleccionada. La región de unión (gen J) se seleccionó de secuencias de región de unión humanas compiladas en *IMGT® the international ImMunoGeneTics information system®* www.imgt.org (fundador y director: Marie-Paule Lefranc, Montpellier, Francia).

Tabla 7

	Línea germinal de HC humana	Región de unión de HC humana (gen J)	Línea germinal de LC humana	Región de unión de LC humana (gen J)
AB1	IGHV1-46 (alelo 1)	IGHJ4 (alelo 1)	IGLV1-39 (alelo 1)	IGKJ2 (alelo 1)
AB3	IGHV3-23 (alelo 1)	IGHJ4 (alelo 1)	IGLV1-39 (alelo 1)	IGKJ2 (alelo 1)
AB4	IGHV1-46 (alelo 1)	IGHJ4 (alelo 1)	IGLV2-30 (alelo 1)	IGKJ2 (alelo 1)
AB9	IGHV1-46 (alelo 1)	IGHJ4 (alelo 1)	IGLV1-39 (alelo 1)	IGKJ2 (alelo 1)
AB11	IGHV3-48 (alelo 1)	IGHJ4 (alelo 1)	IGLV4-1 (alelo 1)	IGKJ2 (alelo 1)
AB18	IGHV1-46 (alelo 1)	IGHJ4 (alelo 1)	IGLV4-1 (alelo 1)	IGKJ2 (alelo 1)

Se definieron las CDR según la definición de AcM (ver el sitio web del Dr. Andrew C. R. Martin www.bioinforg.uk/abs/ para una tabla que compara definiciones de CDR).

Puede requerirse una alteración de posiciones de entramado de línea germinal humanas (es decir, residuos distintos de CDR en VH y VL) a secuencia murina parental correspondiente para optimizar la unión del anticuerpo humanizado. Las secuencias para versiones de anticuerpos humanizados se proporcionan como SEC ID n°: 376-421.

Para AB1, se determinó que cada uno de Asn52 (numeración secuencial) de CDR2 de la HC y Asn54 de CDR2 en la LC tenía un bajo potencial para desamidación basándose en secuencia y conformación.

Para AB3, se determinó que cada uno de Asn31 (numeración secuencial) de CDR1 de la HC, Asn57 de CDR2 de la HC, Asn 28 de CDR1 de LC, y Asn50 de CDR2 de la LC tenía un bajo potencial para desamidación basándose en secuencia y conformación. Se determinó que Trp33 de CDR1 de la HC estaba probablemente expuesto a disolvente y tenía potencial para oxidación, especialmente en condiciones de estrés. En CDR3 de la HC, se

determinó que existe una Cys106 libre dentro de la CDR que podía ser problemática al producir el anticuerpo, ya que es probable que esté expuesta a disolvente. Se recomendó la alteración de este residuo de Cys por Tyr, Ser o Ala. Se somete a prueba la conservación de la unión de estos anticuerpos alterados. Se determinó que Ile53 de CDR2 de la LC estaba expuesto a disolvente y podía conducir a unión no específica. Se sugirió alterar este residuo de Ile por Ser. Se somete a prueba la conservación de la unión de este anticuerpo alterado.

Para AB4, se determinó que cada uno de Asn52 (numeración secuencial) de la CDR2 de HC y Asn58 de CDR2 de la LC tenía un bajo potencial para desamidación basándose en secuencia y conformación. Se determinó que la secuencia DGNT en la CDR1 de la LC era problemática, ya que se determinó que tenía un alto potencial para formación de isoaspartato (en la secuencia DG) así como potencial para desamidación (en la secuencia NT). Se recomendó la alteración de esta secuencia.

Para AB9, se determinó que Asn33 (numeración secuencial) en CDR1 de HC, y Asn52 y Asn59 en CDR2 de HC tenían un bajo potencial para desamidación basándose en secuencia y conformación. Se determinó que Asn54 tenía un potencial medio para desamidación basándose en secuencia y conformación. Se determinó que la secuencia NGG en CDR2 de la HC tenía un potencial alto/medio para desamidación seguida por formación de isoaspartato. Por tanto, se recomendó alterar esta secuencia de aminoácidos. Una Cys106 libre en CDR3 de la HC puede ser problemática cuando se produce el anticuerpo, dado que se determina que está probablemente expuesta a disolvente. Se sugiere la alteración de este residuo de Cys por Tyr, Ser o Ala. Se somete a prueba la conservación de la unión de estos anticuerpos alterados. Arg28 en CDR1 de HC no se encuentra con frecuencia en anticuerpos humanos. Se altera este residuo por Thr y se somete a prueba la conservación de la unión. Para AB9, se determinó que Trp32 (numeración secuencial) en CDR1 de la LC estaba probablemente expuesto a disolvente y podía experimentar oxidación, especialmente en condiciones de estrés. Leu24 de la misma CDR no se encuentra con frecuencia en anticuerpos humanos. Se altera este residuo por Arg y se somete a prueba la conservación de la unión.

Para AB11, se determinó que Asp54-Ser55 (numeración secuencial) en CDR2 de la HC presentaban un bajo potencial para formación de isoaspartato. Se determinó que Asn57 en CDR2 de la LC presentaba un bajo potencial para desamidación basándose en secuencia y conformación.

Para AB18, se determinó que Asn33 y CDR-H2 Asn50 (numeración secuencial) en CDR1 de la HC presentaban un bajo potencial para desamidación basándose en secuencia y conformación. En CDR2 de la HC, se determinó que la secuencia Asp-Pro (DP) presentaba un potencial para experimentar fragmentación en condiciones ácidas. En el dominio VL, se determinó que Asn34 y Asn37 en la CDR1 de la LC presentaban un bajo potencial para desamidación basándose en secuencia y conformación. En CDR3 de la LC, se determinó que Trp56 estaba probablemente expuesto a disolvente y podía experimentar oxidación, especialmente en condiciones de estrés.

La tabla 8 muestra un esquema para combinar la VH y VL humanizadas. Si ninguna de las versiones humanizadas es equivalente al AcM quimérico. Los pares preferidos se muestran en texto en negrita y subrayado.

TABLA 8

Parental	Nº de Ac humanizado	VH (SEC ID nº:)	VL (SEC ID nº:)
AB1	AB1-1	376	380
	AB1-2	377	380
	AB1-3	377	381
	AB1-4	377	382
	AB1-5	377	383
	AB1-6	378	381
AB3	AB3-1	384	h21G5-L1 (opcional)
	AB3-2	385	388
	AB3-3	385	389
	AB3-4	386	388
	AB3-5	386	389
	AB3-6	387	388
	AB3-7 (asimismo denominado AB23)	387	389
AB4	AB4-1	391	397
	AB4-2	392	397
	AB4-3	392	398
	AB4-4	393	398
	AB4-5	394	398
	AB4-6	395	398
	AB4-7	396	398
AB9	AB9-1	403	409
	AB9-2	404	409

	AB9-3	405	410
	AB9-4	405	411
	AB9-5	406	410
	AB9-6	406	411
	AB9-7	407	410
	AB9-8	407	411
	AB9-9	408	410
	AB9-10	408	411
AB11	AB11-1	412	414
	AB11-2	413	414
	AB11-3	413	415
AB18	AB18-1	416	420
	AB18-2	417	420
	AB18-3	417	420
	AB18-4	417	421
	AB18-5	418	420
	AB18-6	418	421
	AB18-7	419	420

Se construyeron anticuerpos humanizados descritos en la tabla 8 y se expresaron tal como se describe esencialmente en el ejemplo 5. Se llevaron a cabo ensayos FACS tal como se describe esencialmente en el ejemplo 5 para determinar fuerzas de unión a antígeno relativas de los anticuerpos humanizados. Se sometieron a prueba dos dosis (1.5 µg o 0.3 µg) de los anticuerpos humanizados para determinar la unión o bien a CLDN6 humana o bien a CLDN6 murina, proteínas que se expresaron en clones 293T modificados por ingeniería. Los resultados de los ensayos se proporcionan en la tabla 9.

Tabla 9

Designación de Ac humanizado	CLDN6 humana (1.5 µg de Ac)	CLDN6 humana (0.3 µg de Ac)	CLDN6 de ratón
Sólo 2º Ac	768.07	768.07	1061.72
64A-chim	224297.77	124463.44	170906.13
h64A	233932.53	93415.06	188577.77
SC27-108-chim	320381.33	150854.98	284326.77
AB1-Chim	364416.49	311923.02	513665.18
AB1-3	142182.2	141773.57	89292.21
AB1-4	197142.08	101763.71	75860.6
AB1-5	213233.57	137828.05	128498.45
AB1-6	227152.34	119699.97	77561.34
AB1-7	207009.91	79207.94	99740.72
AB1-8	209971.67	98785.97	121717.49
AB1-11	112923.25	64892.04	101386.62
AB3-chim	459373.03	267327.83	67927.47
AB3-2	395813.97	309318.89	31741.02
AB3-3	339510.79	250519.45	23038.44
AB3-4	55845.14	11641.7	1521.79
AB3-5	48550.83	13335.93	783.28
AB3-7	169209.42	105881.93	56071.82
AB3-8	151519.51	108419.64	21509.63
AB4-chim	326603.58	176289.63	3639.29
AB4-3	47760.08	14309.78	671.08
AB4-4	48975.26	14081.47	741.03
AB4-5	43385.34	16765.44	2003.95
AB4-6	29243.78	10841.68	14205.6
AB4-7	33342.17	19215.28	6635.91
AB4-8	77642.77	49310.15	4703.98
AB4-9	56854.11	37231.13	1778.41
AB4-10	77159.9	50809.2	2647.29
AB4-11	61204.92	37798.69	1227.86
AB4-12	86189.87	71121.12	1133.16
AB18-chim	135142.76	73775.39	57373.94
AB18-3	58948.59	30357.27	2512.77
AB18-4	54378.24	32424.7	4294.94

ES 3 017 207 T3

AB18-5	51871.17	29448.66	8191.13
AB18-6	58464.54	26883.47	3680.42
AB9-chim	72036.29	46694.71	6745.58
AB9-3	24649.43	9504.6	3175.17
AB9-4	34309.83	15331.51	1709.25
AB11-chim	3491.4	1671.35	5490.52
AB11-2	2557.3	1289.17	7160.15
AB11-3	2364.44	1009.7	5521.52

Asimismo se llevaron a cabo ensayos FACS para determinar fuerzas de unión a antígeno relativas de los anticuerpos humanizados (o bien a 1.5 µg o bien a 0.3 µg) para determinar la unión a CLDN6 tal como se expresa por las líneas celulares de cáncer indicadas. Los resultados de los ensayos se proporcionan en la tabla 10. Se utilizó únicamente 2º Ac como control negativo. Se utilizaron 64A-chim, h64A y SC27-108-chim como anticuerpos de referencia. Se utilizaron anticuerpos parentales correspondientes (anticuerpos previos a la humanización) como controles y se designan con "chim".

Tabla 10

Designación de Ac humanizado	OVCA429, 1.5 µg	ARK2, 1.5 µg	ARK2, 0.3 µg	M202, 1.5 µg	M202, 0.3 µg
Sólo 2º Ac	885.77	1351.21	1351.21	638.83	638.83
64A-chim	140378.55	80449.93	66518.52	1456.2	628.72
h64A	161168.87	69118.48	90346.66	3093.69	2467.63
SC27-108-chim	54987.78	25522.86	62410.85	2293.1	742.74
AB1-Chim	176836.16	51913.52	58762.01	23377.33	9426.64
AB1-3	27535.69	10776.6	2829.25	1225.78	694.08
AB1-4	34551.99	10039.46	3641.11	970.7	697.98
AB1-5	54331.07	22353.67	7494.86	869.06	684.3
AB1-6	29949.91	7743.19	2816.15	880.4	1423.53
AB1-7	44711.89	11224.28	4443.54	876.24	611.15
AB1-8	65974.83	17642.9	5805.35	583.54	1886.84
AB1-11	no sometido a prueba	97659.62	53926.71	5079.26	978.76
AB3-chim	138190.1	29114.68	17055.33	1120.39	843.5
AB3-2	85941.69	33618.84	14656.49	1483.17	727.98
AB3-3	88679.61	54901.39	1156.25	801.56	749.95
AB3-4	2955.8	1459.46	1315.36	839.75	563.41
AB3-5	2951.18	2909.74	1275.51	713.46	611.66
AB3-7	no sometido a prueba	90420.04	35995.73	7841	1742.34
AB3-8	no sometido a prueba	23259.52	11856.48	1903.05	952.71
AB4-chim	64796.15	38447.83	19142.38	1343.31	1007.71
AB4-3	1155.95	1522.98	1192.96	708.25	984.95
AB4-4	1203.16	1398.82	1048.05	899.25	618.43
AB4-5	1351.27	1198.66	966.62	1203.98	653.41
AB4-6	no sometido a prueba	9842.52	3303.34	2520.88	1281.68
AB4-7	no sometido a prueba	7563.59	2765.93	3322.65	1444.19
AB4-8	no sometido a prueba	7313.46	3118.74	1495.74	974.83
AB4-9	no sometido a prueba	7787.35	3058.96	1179.5	825.33
AB4-10	no sometido a prueba	20227.28	7212.1	1392.45	546.63
AB4-11	no sometido a prueba	9167.61	6392.04	895.77	549.19
AB4-12	no sometido a prueba	24221.65	9690.02	2015.4	1506.93
AB18-chim	25521.37	9149.19	3442.7	1048.6	895.4
AB18-3	2703.41	1210.4	1079.32	684.33	592.8
AB18-4	3220.08	1379.11	1134.22	1231.31	762.51
AB18-5	4273.83	1330.44	1313.83	1001.99	594.43
AB18-6	6753.92	1936.48	1393.53	914.2	865.43
AB9-chim	3569.69	4487.55	3508.75	1331.44	680.03
AB9-3	1257.3	1471.97	1139.54	1659.76	1111.31
AB9-4	1110.93	1553.6	1116.78	1149.55	625.38
AB11-chim	2440.63	1260.97	1315.28	973.48	610.05
AB11-2	2694.81	1937.51	1400.43	1766.07	872.68
AB11-3	2201.32	1541.47	1320.38	1134.3	940.92

"chim" es la forma previa a la humanización del anticuerpo.

Basándose en los datos de unión a antígeno *in vitro*, se seleccionaron tres anticuerpos humanizados para pruebas y desarrollo adicionales. Los anticuerpos derivaron de AB1, AB3 y AB4.

Se llevaron a cabo estudios de unión *in vivo* de las versiones humanizadas de AB1, AB3 y AB4 en ratones con xenoinjerto a los que se les inyectaron líneas celulares de cáncer de vejiga UMUC4, tal como se describe esencialmente en el ejemplo 6. En resumen, se establecieron modelos de xenoinjerto de UMUC4 en ratones desnudos atímicos CD-1 de seis semanas de edad (Charles River Laboratories). Después de que los tumores alcanzaron un tamaño medio de 150 a 300 mm³, se aleatorizaron los ratones a grupos de tratamiento. Se diluyeron anticuerpos humanizados en solución salina estéril hasta una concentración de trabajo de 1 mg/ml para inyección intravenosa en la vena de la cola (i.v.). Se midieron los xenoinjertos de tumor con calibres tres veces por semana, y se determinó el volumen tumoral en mm³ multiplicando la altura × anchura × longitud. Se trató a los ratones durante 2-7 semanas. Al final del estudio, se sacrificó a los animales y se escindió el tejido tumoral y se dividió para almacenarse como tejido congelado o incorporado en parafina y fijado con formalina (FFPE) para análisis de biomarcadores.

Los resultados de los ensayos de xenoinjertos se muestran en la figura 15 a la figura 21. La figura 15 muestra los resultados de ensayos de xenoinjertos para dos versiones de AB3 humanizado (AB3-2 y AB3-4), en los que el tratamiento implicó 10 mg/kg administrados Q4D. Los controles incluyeron control de vehículo (PBS), IgG humana (10 mg/kg Q4D) y la versión murina de AB3 (10 mg/kg Q4D). Tal como se muestra en esta figura, AB3-4 humanizado demostró una reducción del volumen tumoral a lo largo del periodo de tratamiento de 35 días. La figura 16 representa los resultados de ensayos de xenoinjertos para los mismos tratamientos que los experimentos representados en la figura 15, con la excepción de que se llevaron a cabo dos controles adicionales (64A MSE y una versión quimérica del mismo (64A-CHIM)). Como en la figura 15, la figura 16 representa una marcada reducción del volumen tumoral tras el tratamiento con AB3-4 humanizado.

La figura 17 representa los resultados de ensayos de xenoinjertos para AB1-5 humanizado. Los controles incluyeron control de vehículo (PBS), IgG humana (10 mg/kg Q4D) y la versión murina de AB1 (10 mg/kg Q4D). Tal como se representa en la figura 17, los ratones tratados con AB1-5 humanizado demostraron una marcada reducción del volumen tumoral.

La figura 18 representa los resultados de ensayos de xenoinjertos para AB4-3 humanizado. Los controles incluyeron control de vehículo (PBS), IgG humana (10 mg/kg Q4D) y la versión murina de AB4 (10 mg/kg Q4D). Los ratones tratados con AB4-3 humanizado no demostraron una marcada reducción del volumen tumoral.

De la figura 19 a la figura 21 demuestran los resultados de un ensayo de xenoinjertos en el que se sometieron a prueba los 4 anticuerpos humanizados de la figura 15 a la figura 18. Se utilizaron versiones de ratón y quimérica de anticuerpos de referencia frente a CLDN6 como controles. Tal como se representa en la figura 19, los ratones tratados con AB3-4 humanizado y AB1-5 demostraron una reducción del volumen tumoral. La figura 20 demuestra el volumen tumoral a lo largo del transcurso de tiempo hasta el día 55. Los pesos corporales de ratones en el ensayo se muestran en la figura 21.

Ejemplo 10

Se llevó a cabo un análisis *in silico* con diferentes secuencias de AB1, AB3 y AB4. En particular, se alinearon las secuencias para (a) el clon parental original, (b) la secuencia de línea germinal de ratón más próxima, (c) la secuencia de línea germinal humana más próxima, y (d) la secuencia humanizada, para cada anticuerpo. Los aminoácidos que se cree que han experimentado maduración por afinidad están marcados con asterisco, mientras que los aminoácidos que difieren de los aminoácidos en esa posición según la información de la base de datos de anticuerpos están marcados con almohadilla. Las CDR para cada secuencia están encerradas en recuadros. Basándose en este análisis, se producirán varios anticuerpos humanizados que presentan una secuencia indicada en la tabla 10.

Tabla 10

Clon parental	Secuencia consenso de HC	Secuencia consenso de LC
AB1	422	423
AB3	424	425
AB4	426	427

Se producen múltiples anticuerpos que presentan una secuencia tal como se define mediante estas secuencias consenso tal como se describe esencialmente en el ejemplo 5 y se someten a prueba *in vitro* para determinar la unión a antígeno mediante FACS (tal como se describe esencialmente en el ejemplo 5) e *in vivo* para determinar la capacidad para reducir el volumen tumoral en ratones (tal como se describe esencialmente en el ejemplo 6).

Ejemplo 11

Este ejemplo describe un análisis de secuenciación de nueva generación (NGS) de anticuerpos frente a CLDN6 de la presente divulgación.

Se sometieron las secuencias de AB1 y AB3 a análisis de NGS para identificar variantes relacionadas con hipermutación somática (SHM) de la cadena pesada y cadena ligera para cada anticuerpo. El análisis de NGS identificó puntos de SHM en ambas de las secuencias de cadena pesada y ligera para cada anticuerpo. El análisis reveló 1452 secuencias de cadena pesada diferentes y 326 secuencias de cadena ligera diferentes para AB3 y 372 secuencias de cadena pesada diferentes y 3081 secuencias de cadena ligera diferentes para AB1. Se muestran resultados de ejemplo en la figura 23 a la figura 26. La figura 23 y la figura 24 muestran cambios identificados en cadenas pesada y ligera de un AB3 variante, respectivamente, mientras que la figura 25 y la figura 26 muestran cambios identificados en cadenas pesada y ligera de un AB1 variante, respectivamente. Se proporcionan mutaciones en numeración de Chothia en la parte inferior de cada figura.

Se seleccionaron anticuerpos con SHM identificada mediante NGS en la cadena pesada basándose en la probabilidad de implicación en la unión. Se produjeron seis anticuerpos basándose en AB3-7 humanizado (AB S1-S6) y se produjeron seis anticuerpos basándose en AB1-11 humanizado (AB S7-S12) y posteriormente se evaluaron para determinar el fenotipo. La figura 22 es un listado de las secuencias de cadena pesada parental y las 12 variantes emparejadas con secuencias de cadena ligera. Se llevaron a cabo estudios de unión de FACS de los 12 anticuerpos (AB S1-S12) tal como se describe esencialmente en la presente memoria y los resultados se muestran en la figura 27.

Asimismo se llevaron a cabo ensayos de unión de FACS con diferentes cantidades de AB S1-S12. Las concentraciones de anticuerpo sometidas a prueba en este ensayo de dilución limitante fueron de 0.32 nM, 1.6 nM, 8 nM, 40 nM, 200 nM y 1000 nM y se utilizaron diferentes líneas celulares que expresaban CLDN6. Los resultados se muestran en la figura 28.

Estos datos respaldan que los anticuerpos recién identificados (S1-S12) demostraron una unión aumentada con respecto al anticuerpo humanizado parental correspondiente.

Ejemplo 12

Este ejemplo demuestra el análisis *in vivo* de anticuerpos humanizados descritos en la presente memoria.

Se llevaron a cabo estudios *in vivo* en ratones con xenoinjerto a los que se les inyectaron líneas celulares de cáncer humanas tal como se describe esencialmente en el ejemplo 6. En este estudio, se utilizaron células de la línea celular UMUC4, una línea celular de cáncer de vejiga que expresa fuertemente CLDN6, y de la línea celular OV-90, una línea celular de cáncer de ovarios que expresa CLDN6. Ambas líneas celulares son tumorigénicas cuando se administran a ratones por vía subcutánea. En resumen, se establecieron modelos de xenoinjerto de líneas celulares de cáncer humanas en ratones desnudos atímicos CD-1 de seis semanas de edad (Charles River Laboratories). Se siguieron las siguientes condiciones para la inyección subcutánea de cada línea celular: UMUC4 1.0×10^7 y OV90 1.0×10^7 , todas con Matrigel al 50 % (BD Biosciences). A ratones desnudos CD-1 (8 ratones por grupo) se les inyectó por vía subcutánea en el costado derecho la línea celular UMUC4 o OV-90. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de 150 a 300 mm³, se aleatorizaron los ratones a grupos de tratamiento. Para el tratamiento, se diluyó cada anticuerpo terapéutico (AB1-11 humanizado, AB3-7 humanizado) y un anticuerpo de control de IgG humana en solución salina estéril y se administraron mediante inyección intravenosa en la vena de la cola (i.v.) a 10 mg/kg una vez cada 4 días diariamente (Q4D, figura 30) o una vez por semana (QW, figura 31). Se midieron los xenoinjertos de tumor con calibres tres veces por semana, y se determinó el volumen tumoral en mm³ multiplicando la altura $\times$ anchura $\times$ longitud. Se trató a los ratones durante 21-36 días. Al final del estudio, se sacrificó a los animales y se escindió el tejido tumoral y se dividió para almacenarse como tejido congelado o incorporado en parafina y fijado con formalina (FFPE) para análisis de biomarcadores. Todo el trabajo con animales se llevó a cabo según un protocolo aprobado por IACUC y la University of California en el Animal Research Committee de Los Ángeles. Se analizaron los datos utilizando el software StudyLog de StudyDirector (San Francisco, CA). Los resultados se presentan como volúmenes medios para cada grupo. Las barras de error representan el error estándar (EE) de la media.

Los resultados de los ensayos de xenoinjertos se muestran en la figura 30 y la figura 31. Tal como se representa en la figura 30, el tratamiento Q4D con AB1-11 o AB3-7 condujo a reducciones notables de volúmenes tumorales o tumores de UMUC4 con respecto a ratones tratados con control. Ambos anticuerpos humanizados alcanzaron una reducción de 60 % del volumen tumoral con respecto a ratones de control al final del periodo de estudio.

Tal como se muestra en la figura 31, los volúmenes de tumores OV-90 de ratones tratados con cualquier anticuerpo humanizado fueron menores que el volumen tumoral de ratones tratados con control. Al final del estudio, AB1-11 alcanzó una reducción de 33 % del volumen tumoral con respecto a ratones de control mientras que AB3-7 alcanzó una reducción de 16 %.

Estos datos respaldan que los anticuerpos humanizados conservan la eficacia terapéutica observada por primera vez con los anticuerpos de ratón correspondientes.

5 Ejemplo 13

Este ejemplo demuestra un conjugado de anticuerpo-fármaco sometido a prueba *in vivo*.

Se produjo un conjugado que comprendía MMAE y AB1-11 y se sometió a prueba *in vivo* utilizando ratones con xenoinjerto a los que se les inyectaron líneas celulares de cáncer de ovarios OV-90 que expresaban CLDN6 tal como se describe esencialmente en el ejemplo 6. En este experimento, a ratones desnudos CD-1 (8 ratones por grupo) se les inyectaron por vía subcutánea en el costado derecho células OV-90. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de 150 a 300 mm³, se aleatorizaron los ratones a grupos de tratamiento. Para el tratamiento, se administraron a los ratones una vez por semana mediante inyección en la vena de la cola (1) 10 mg/kg de anticuerpo AB1-11 humanizado, (2) 10 mg/kg de un anticuerpo de control de IgG humana, (3) 5 mg/kg de conjugado no dirigido ("untargeted") que comprende MMAE sin AB1-11, y (4) 10 mg/kg de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) dirigido ("targeted") que comprende MMAE y AB1-11. El conjugado no dirigido comprendía MMAE conjugado a un anticuerpo de control de IgG humana sin dianización. Se midieron los xenoinjertos de tumor con calibres tres veces por semana, y se determinó el volumen tumoral en mm³ multiplicando la altura × anchura × longitud. Se trató a los ratones durante 20-36 días. Al final del estudio, se sacrificó a los animales y se escindió el tejido tumoral y se dividió para almacenarse como tejido congelado o incorporado en parafina y fijado con formalina (FFPE) para análisis de biomarcadores. Todo el trabajo con animales se llevó a cabo según un protocolo aprobado por IACUC y la University of California en el Animal Research Committee de Los Ángeles. Se analizaron los datos utilizando el software StudyLog de StudyDirector (San Francisco, CA). Los resultados se presentan como volúmenes medios para cada grupo. Las barras de error representan el error estándar (EE) de la media.

Tal como se representa en la figura 32, la administración del ADC dirigido condujo a una reducción sustancial del volumen tumoral. Al final del estudio, el volumen tumoral de ratones tratados con el ADC dirigido mostró una reducción de más de 70 % con respecto a ratones tratados con control.

Se llevó a cabo el mismo análisis *in vivo* con ratones a los que se les inyectaron por vía subcutánea células de cáncer de vejiga UMUC4 en lugar de células OV-90 y se administraron los tratamientos una vez por semana mediante inyección en la vena de la cola (1) 10 mg/kg de anticuerpo AB1-11 humanizado, (2) 10 mg/kg de un anticuerpo de control de IgG humana, (3) 5 mg/kg de conjugado no dirigido que comprende MMAE sin AB1-11, y (4) 10 mg/kg de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) dirigido que comprende MMAE y AB1-11. El conjugado no dirigido comprendía MMAE conjugado a un anticuerpo de control de IgG humana sin dianización. El conjugado dirigido se administró un total de 3 veces, mientras que los otros tratamientos se administraron una vez por semana 5 veces en total. Se realizaron mediciones del volumen tumoral tal como se describió anteriormente, aunque se realizaron mediciones para los ratones tratados con ADC dirigido durante hasta 80 días.

Tal como se muestra en la figura 33, la administración del ADC dirigido demuestra volúmenes tumorales que disminuyen desde casi 200 mm³ hasta casi 0 mm³. El efecto continuó hasta 80 días del estudio o más de aproximadamente 60 días tras el último tratamiento con ADC.

Estos datos respaldan que un conjugado de anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo de la presente divulgación es eficaz para reducir el tamaño tumoral y para tratar el cáncer.

Ejemplo 14

Este ejemplo demuestra la caracterización *in vitro* de los ADC frente a CLDN6.

Se produjeron ADC que comprendían diversas combinaciones de conector-fármaco con un anticuerpo AB3-7 humanizado (asimismo denominado AB23, véase, por ejemplo, la tabla 8): (a) VC-PAB-MMAE, (b) GGFG-MMAE, (c) CL2A-SN38, (d) GGFG-Dxd, y (e) VC-PAB-Dxd. Los ADC se prepararon en WuXi Biologies (Shanghái, China).

De la figura 34A a la figura 34H se representa la caracterización bioquímica de los ADC frente a CLDN6 que comprenden AB3-7. La figura 34A es una tabla que resume las propiedades bioquímicas de los siete ADC frente a CLDN6 que comprenden AB3-7. Los ADC que están etiquetados como D4 se refieren a conjugados sustancialmente homogéneos que comprenden un número significativo de anticuerpos que están conjugados a 4 fármacos por anticuerpo (tecnología de D4, una tecnología de WuXi Biologies). Los ADC que están etiquetados como CTRL se refieren a conjugados heterogéneos convencionales (convencionales) que comprenden la distribución gaussiana del número de fármacos por anticuerpo. Los ADC comprendían un bajo porcentaje de anticuerpo no conjugado, especies de alto peso molecular (HMW) y fármacos libres no conjugados. Los ADC asimismo comprendían un bajo nivel de endotoxina, haciendo que fueran adecuados para estudios *in vivo*. De la figura 34B a la figura 34H se representan los cromatogramas de HIC-HPLC que muestra la abundancia relativa del anticuerpo conjugado a diferentes números de fármacos para cada ADC. Por ejemplo, el área de pico bajo D0

indica la abundancia relativa de AB3-7 no conjugado. De manera similar, el área de pico bajo D1, D2, D3...D8 indica la abundancia relativa de anticuerpo AB3-7 conjugado a 1, 2, 3... 8 fármacos por anticuerpo.

La figura 35 representa que la integridad molecular de los ADC frente a CLDN6 que comprenden AB3-7 no se vio alterada por la conjugación. La integridad molecular de los ADC frente a CLDN6 y anticuerpo AB3-7 no conjugado se evaluó mediante NativePAGE (geles de proteína con Bis-Tris al 4-16 % NativePAGE (nº de cat. BN1002BOX, ThermoFisher). La PAGE natural separa proteínas según la carga neta, tamaño y forma de su estructura natural. En la condición natural, los siete ADC frente a CLDN6 permanecen estructuralmente intactos y mostraron cualquier indicación de degradación en comparación con el anticuerpo AB3-7 no conjugado. Por tanto, la conjugación no altera la integridad molecular del anticuerpo AB3-7.

La figura 36 muestra que la conjugación no afecta a la afinidad de unión del anticuerpo AB3-7. La citometría de flujo muestra que los ADC frente a CLDN6 que comprenden AB3-7 conservaron la afinidad de unión alta y específica por CLDN6. Se analizó la actividad de unión de ADC mediante citometría de flujo para tres líneas celulares: (a) línea celular de cáncer de vejiga UMUC4 (que expresa CLDN6 de manera natural), (b) HEK293T CLDN6-mGFP A11 (modificada por ingeniería para sobreexpresar (OE) artificialmente CLDN6), y (c) línea celular de melanoma M202 (células negativas para CLDN6). Específicamente, se incubaron los ADC con ~150,000 células en 50 µl del 2 % de FBS/PBS a 4°C durante 30 min, seguido por lavado con el 2 % de FBS/PBS. Después se incubaron los ADC con anticuerpo anti-Fc de IgG humana con Alexa Fluor® 647 de Biolegend (409320) a 4°C durante 30 min. Se midió la unión mediante citómetro de flujo BD Accuri™ C6. Siete ADC frente a CLDN6 diferentes mostraron una afinidad de unión similar mediante citometría de flujo en comparación con su anticuerpo AB3-7 no conjugado para líneas celulares positivas para CLDN6 (células UMUC4 y HEK293T CLDN6-mGFP A11), mientras que no mostraron ninguna unión para una línea celular negativa para CLDN6 (M202).

La figura 37 muestra adicionalmente que la conjugación no afecta a la afinidad de unión del anticuerpo AB3-7. Las mediciones de la constante de disociación (KD) demostraron que los ADC frente a CLDN6 que comprenden AB3-7 conservaron la afinidad de unión alta y específica por CLDN6. Se midió la afinidad de anticuerpos basada en células (KD) de los ADC frente a CLDN6 mediante KinExA 4000 (Sapidyne Instrument, Boise, Idaho). En resumen, se desprendieron células HEK293T CLDN6-mGFP A11 utilizando Versene y se equilibraron o bien con 500 pM o bien con 10 nM de anticuerpo en el 2 % de FBS/DMEM a 4°C durante la noche. La concentración celular comenzó a 5×10^6 células/ml y se realizaron diluciones en serie 2 veces hasta 10 puntos. Al día siguiente, se centrifugaron las células a 1500 rpm durante 10 min y se guardaron los sobrenadantes. Se recubrieron previamente las perlas de PMMA (Sapidyne Instrument, nº de cat. 440176) anticuerpo de cabra anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch Labs (nº de cat. 109-005-003) a 30 µg/ml. Se diluyó anticuerpo secundario fluorescente, anticuerpo de cabra anti-IgG humana con Alexa Fluor® 647 AffiniPure (Jackson ImmunoResearch Labs, nº de cat. 109-605-088) en el 1 % de BSA/PBS a 0.5 µg/ml. Asimismo se incluyeron controles de disolución de anticuerpo sola (señal del 100 %) y de unión no específica (NSB, tampón solo) en las mediciones. Se calculó la KD utilizando dos curvas de anticuerpos analizadas mediante el análisis de n curvas. Tal como se demuestra en la figura 37, la afinidad de unión (KD) es similar a lo largo de todos los ADC y AB3-7 no conjugado. Por tanto, la conjugación a diversas combinaciones de conector-fármaco no alteró la afinidad de unión de anticuerpo por CLDN6 expresada en las células HEK293T CLDN6-mGFP A11.

La figura 38 muestra que los ADC frente a CLDN6 que comprenden AB3-7 se internalizan de manera eficiente por células cancerosas, una etapa importante en la activación de los ADC. Específicamente, se tiñeron células ARK2 (carcinosarcoma uterino que expresa CLDN6) con núcleo (azul), lisosoma (verde) y los ADC frente a CLDN6 (rojo). Las imágenes en los paneles superiores se tomaron en una fase inicial (dentro del plazo de 30 min tras la tinción de ADC/anticuerpo) y las de los paneles inferiores se tomaron en una fase posterior (entre 5-6 horas tras la tinción de ADC/anticuerpo) para mostrar la internalización de CLDN6 complejo con ADC o anticuerpo no conjugado. Tal como se demuestra en la figura 38, la conjugación no cambió las tasas de internalización de anticuerpo en comparación con las de su anticuerpo AB3-7 no conjugado.

Ejemplo 15

Este ejemplo demuestra la actividad anticancerosa *in vitro* de los ADC frente a CLDN6 frente a células cancerosas.

De la figura 39A a la figura 39G se representa el efecto antiproliferativo en 2D de diferentes ADC frente a CLDN6 que comprenden AB3-7 sobre células cancerosas. Se sometió a prueba la actividad antiproliferativa de los ADC frente a CLDN6 frente a cuatro líneas celulares de cáncer; líneas celulares positivas para CLDN6 (UMUC4, OV90) y líneas celulares negativas para CLDN6 (MCF7, M202). Se sembró cada línea celular de manera uniforme en pocillos de placas de 48 pocillos, oscilando desde 300-1000 células por pocillo. Después de 48 h, se midió una medición de nivel inicial del número de células por pocillo por línea celular. Los pocillos restantes de células se trataron con una dilución en serie 1:5 de 6 concentraciones de fármaco, dando como resultado una concentración de tratamiento final que oscilaba desde 200 nM (30 ng/ml) hasta 0.064 nM (0.0096 ng/ml). Después de 7 días, se evaluó la actividad antiproliferativa comparando los recuentos de células en los tratados frente a control sin tratamiento.

Tal como se demuestra en la figura 39A a la figura 39G, los ADC frente a CLDN6 que comprenden MC-VC-PAB-MMAE (convencional) y MC-VC-PAB-MMAE (tecnología de D4) fueron comparables en cuanto a mostrar la mayor potencia antiproliferativa y especificidad frente a las células positivas para CLDN6 (UMUC4). Los ADC frente a CLDN6 que comprenden CL2A-SN38 (convencional) y CL2A-SN38 (tecnología de D4) mostraron una potencia antiproliferativa igualmente similar pero no fueron específicos, destruyendo sin distinción entre las células positivas para CLDN6 y células negativas para CLDN6. Los ADC frente a CLDN6 que comprenden MC-GGFG-MMAE mostraron una baja potencia antiproliferativa con especificidad frente a las células positivas para CLDN6 (UMUC4). Los ADC frente a CLDN6 que comprenden MC-GGFG-DXD y MC-VC-PAB-DXD no muestran ningún efecto antiproliferativo frente a ninguna línea celular.

De la figura 39H a la figura 39N se representa el efecto antiproliferativo en 2D del AB1-11 que comprende CLDN6 conjugado a VC-PAB-MMAE (ADC-11) frente a diversas líneas celulares. Específicamente, se sometieron a prueba cuatro líneas celulares: líneas celulares positivas para CLDN6 (ARK2, OVCA429, H841, OV90, H1693) y líneas celulares negativas para CLDN6 (MCF7, M202). Se sembró cada línea celular de manera uniforme en pocillos de placas de 48 pocillos, oscilando desde 300-1000 células por pocillo. Después de 48 h, se midió una medición de nivel inicial del número de células por pocillo por línea celular. Los pocillos restantes de células se trataron con diluciones en serie 1:5 de (a) ADC-11 dirigido a CLDN6, (b) un ADC de control (una IgG sin dianización conjugada a VC-PAB-MMAE), (c) una IgG sin dianización no conjugada, y (d) AB1-11 no conjugado, dando como resultado la concentración de tratamiento final que oscila desde 1000 nM (150 ng/ml) hasta 0.32 nM (0.0048 ng/ml). Después de 7 días, se evaluó la actividad antiproliferativa comparando los recuentos de células en los tratados frente a control sin tratamiento.

Tal como se demuestra en la figura 39H a la figura 39N, ADC-11 mostró una actividad antiproliferativa robusta frente a líneas celulares positivas para CLDN6 (ARK2, OVCA429, H841, OV90, H1693) sin actividad frente a las líneas celulares negativas para CLDN6 (M202 y MCF7).

Ejemplo 16

Este ejemplo muestra la eficacia anticancerosa *in vivo* de los ADC frente a CLDN6 frente a xenoinjertos de línea celular de cáncer.

Para todos los experimentos *in vivo*, se midieron los xenoinjertos de tumor con calibres 3 veces/semana, y se determinó el volumen tumoral en mm³ multiplicando la altura x anchura x longitud. Todo el trabajo con animales se llevó a cabo según un protocolo aprobado por IACUC y el UCLA Animal Research Committee. Se analizaron los datos utilizando el software StudyLog de StudyDirector (San Francisco, CA).

La figura 40 representa la eficacia anticancerosa de un ADC frente a CLDN6 frente a xenoinjertos de línea celular de cáncer de ovarios positiva para CLDN6 (OV90). El ADC frente a CLDN6 sometido a prueba en la presente memoria comprende un AB1-11 humanizado conjugado a VC-PAB-MMAE (ADC-11; convencional). Se establecieron los xenoinjertos de línea celular de cáncer de ovarios OV90 en ratones desnudos atímicos CD-1 de seis semanas de edad (Charles River Laboratories) mediante inyección subcutánea de 1.0×10^7 células con Matrigel al 50 % (BD Biosciences) en el costado trasero derecho del animal. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de 100-200 mm³, se aleatorizaron los ratones (n=8) a grupos de tratamiento de 1) anticuerpo de control de IgG1 humana sin dianización a 10 mg/kg QW i.v. 4 semanas, 2) CLDN6-AB1-11 humanizado (HU-11) a 10 mg/kg QW i.v. (inyección intravenosa) durante 4 semanas, 3) ADC-11 a 5 mg/kg QW i.v. durante 3 semanas, y 4) ADC de control sin dianización a 5 mg/kg QW i.v. durante 3 semanas. Se realizó un seguimiento de los xenoinjertos tras la administración de la dosis hasta la progresión tumoral. El tratamiento con el ADC frente a CLDN6 dio como resultado regresión tumoral del xenoinjerto. La actividad del ADC frente a CLDN6 es superior a la observada con el AcM frente a CLDN6 no conjugado o ADC de control sin dianización.

De la figura 41A a la figura 41B no se muestra actividad anticancerosa de ADC-11 frente a CLDN6 (convencional) frente a xenoinjertos de línea celular de cáncer de melanoma negativa para CLDN6 (M202). ADC-11 no mostró ninguna actividad anticancerosa en xenoinjertos de línea celular M202 que no expresan CLDN6. Los xenoinjertos de línea celular de cáncer de melanoma M202 se establecieron en ratones desnudos atímicos CD-1 de seis semanas de edad (Charles River Laboratories) mediante inyección subcutánea de 1.0×10^7 células con Matrigel al 50 % (BD Biosciences) en el costado trasero derecho del animal. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de 100-300 mm³, se aleatorizaron los ratones (n=8) a grupos de tratamiento de 1) anticuerpo de control de IgG1 humana sin dianización a 10 mg/kg QW i.v. 4 semanas o 2) ADC-11 a 5 mg/kg QW i.v. durante 3 semanas. La falta de actividad anticancerosa del ADC frente a CLDN6 frente a xenoinjertos negativos para CLDN6 demuestra la especificidad de la actividad de ADC frente a CLDN6.

De la figura 42A a la figura 42B se representa la eficacia anticancerosa *in vivo* de ADC-23 frente a CLDN6 frente a xenoinjertos de línea celular de cáncer. El ADC frente a CLDN6 sometido a prueba en la presente memoria comprende AB3-7 humanizado conjugado a VC-PAB-MMAE (ADC-23; convencional). La figura 42A muestra que ADC-23 frente a CLDN6 es eficaz frente a xenoinjertos de línea celular de vejiga positiva para CLDN6 (UMUC4). Específicamente, los xenoinjertos de línea celular de cáncer de vejiga UMUC4 se establecieron en ratones

desnudos atímicos CD-1 de seis semanas de edad (Charles River Laboratories) mediante inyección subcutánea de 1.0×10^7 células con Matrigel al 50 % (BD Biosciences) en el costado trasero derecho del animal. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de 100-200 mm³, se aleatorizaron los ratones (n=8) a grupos de tratamiento de 1) anticuerpo de control de IgG1 humana sin dianización (Hu-IgG1) a 10 mg/kg una vez por semana (QW i.v.) durante 4 semanas, 2) anticuerpo AB3-7 frente a CLDN6 humanizado (Hu23) a 10 mg/kg QW i.v. durante 4 semanas, 3) ADC-23 a 5 mg/kg QW i.v. durante 3 semanas. Se realizó un seguimiento de los xenoinjertos tras la administración de la dosis hasta la progresión tumoral o 60 días tras el inicio del tratamiento. La figura 42B muestra la tinción con hematoxilina y eosina (H&E) de los tejidos de xenoinjerto recogidos en los puntos de tiempo indicados tras el tratamiento o bien con anticuerpo de control Hu-IgG1 o bien con ADC-23 a 5 mg/kg. El análisis histopatológico del tejido de xenoinjerto recogido durante el estudio mostró que el contenido en células de tumor epitelial se perdió en los ratones tratados con ADC-23 (figura 42B).

El tratamiento con el ADC-23 frente a CLDN6 dio como resultado regresión tumoral de los xenoinjertos en los xenoinjertos de línea celular UMUC4 positiva para CLDN6. Los datos presentados en la figura 42A a la figura 42B y los presentados anteriormente demuestran que ambos ADC frente a CLDN6 (ADC-11 y ADC-23) son eficaces para seleccionar como diana xenoinjertos de línea celular positiva para CLDN6.

Ejemplo 17

Este ejemplo muestra la actividad anticancerosa *in vivo* de ADC-23 frente a CLDN6 frente a xenoinjertos derivados de paciente (PDX).

De la figura 43A a la figura 43E se representa la eficacia anticancerosa *in vivo* de ADC-23 frente a CLDN6 (convencional) frente a modelos de PDX de cáncer de ovarios. Específicamente, se examinó un panel de muestras de PDX de ovarios para detectar la expresión de proteína CLDN6 mediante análisis por inmunotransferencia de tipo Western (figura 43A). Se seleccionaron dos muestras positivas para CLDN6 (DF189 y DF181) y una negativa para CLDN6 (DF20) para el estudio. Se transfectaron células de cáncer de ovarios de cada PDX con la enzima luciferasa antes de la inyección en el espacio intraperitoneal de ratones inmunocomprometidos (NSG) (figura 43B). De la figura 43C a la figura 43E se representa la producción de actividad luciferasa que se midió una vez por semana en ratones tratados con (1) anticuerpo de control de Hu-IgG1 sin dianización a 10 mg/kg QW i.v. 4 semanas, (2) AB3-7 frente a CLDN6 humanizado a 10 mg/kg QW i.v. durante 4 semanas, o (3) ADC-23 a 5 mg/kg QW i.v. durante 3 semanas. Los ratones tratados con control de Hu-IgG1 o AcM AB3-7 frente a CLDN6 mostraron un aumento continuo de carga tumoral en el espacio intraperitoneal hasta que tuvo que sacrificarse a los ratones aproximadamente a los 50 días tras la implantación de las células cancerosas para cada uno de los modelos de PDX sometidos a prueba. Sin embargo, los ratones tratados con ADC-23 mostraron una reducción significativa de la carga tumoral y una mejora significativa de la supervivencia global. Estas respuestas se limitaron a ratones a los que se les inyectaron las células de cáncer de ovarios positivas para CLDN6 (figura 43C y figura 43D). El modelo DF20 negativo para CLDN6 únicamente mostró un beneficio limitado del tratamiento sin impacto sobre la supervivencia global (figura 43E).

Ejemplo 18

Este ejemplo muestra la actividad dependiente de la dosis de ADC-23 frente a CLDN6.

De la figura 44A a la figura 44C se representa la actividad anticancerosa dependiente de la dosis de ADC-23 frente a CLDN6 (tecnología de D4) frente a los xenoinjertos de línea celular de cáncer de ovarios positiva para CLDN6 (OV90). Los xenoinjertos de línea celular de cáncer de ovarios OV90 se establecieron en ratones desnudos atímicos CD-1 de seis semanas de edad (Charles River Laboratories) mediante inyección subcutánea de 1.0×10^7 células con Matrigel al 50 % (BD Biosciences) en el costado trasero derecho del animal. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de ~200 mm³, se aleatorizaron los ratones (n=6) a grupos de tratamiento. Se trataron ratones con xenoinjertos OV90 con diversas dosis que oscilaban desde 0.1 mg/kg hasta 2.5 mg/kg i.v. QW durante 3 semanas. Se observó una reducción de la actividad antitumoral a medida que disminuyó la concentración de dosificación. El tratamiento con 2.5 mg/kg de ADC-23 frente a CLDN6 indujo regresiones de xenoinjertos uniformes (figura 44A y figura 44B). No se observó ningún impacto sobre el peso corporal de ratones en respuesta al tratamiento con ADC-23 frente a CLDN6 a ninguna dosis administrada (figura 44C). Por tanto, se confirmó la actividad selectiva y dependiente de la dosis del ADC-23 frente a CLDN6 novedoso en los xenoinjertos de línea celular de cáncer de ovarios positiva para CLDN6.

De la figura 45A a la figura 45C se muestra que no existe ninguna actividad inespecífica del ADC-23 frente a CLDN6 (tecnología de D4) en los xenoinjertos de línea celular de cáncer de melanoma negativa para CLDN6 (M202). Los xenoinjertos de línea celular de cáncer de melanoma M202 se establecieron en ratones desnudos atímicos CD-1 de seis semanas de edad (Charles River Laboratories) mediante inyección subcutánea de 1.0×10^7 células con Matrigel al 50 % (BD Biosciences) en el costado trasero derecho del animal. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de ~200 mm³, se aleatorizaron los ratones (n=6) a grupos de tratamiento. Se trataron ratones que portaban los xenoinjertos de melanoma M202 con diversas dosis que oscilaban desde 0.1 mg/kg hasta 2.5 mg/kg i.v. QW durante 3 semanas. No se observó ninguna actividad anticancerosa del ADC frente a CLDN6

frente a xenoinjertos M202 negativos para CLDN6 a ninguna dosis administrada (de figura 45A a la figura 45B). No se observó ningún impacto sobre el peso corporal de ratones en respuesta al tratamiento con ADC frente a CLDN6 a ninguna dosis administrada (figura 45C).

- 5 Debe interpretarse que la utilización de los términos “un” y “una” y “el/la” y referentes similares en el contexto de la descripción de la divulgación (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) comprende tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o resulte claramente contradicho por el contexto. Los términos “que comprende”, “que presenta”, “que incluye” y “que contiene” deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significan “que incluye, pero no se limita a”) a menos que se
- 10 indique lo contrario.

REIVINDICACIONES

1. Conjugado que comprende una proteína de unión a antígeno aislada que se une a claudina-6 o fragmento de unión a antígeno de la misma, un agente citotóxico o un agente quimioterápico y un conector, en el que la proteína de unión a antígeno se seleccionada de entre:

(a) una proteína de unión a antígeno que comprende:

(i) una CDR1 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de FTFSXYX (SEC ID nº: 455), en la que X en la posición 5 es N y X en la posición 7 es W;

(ii) una CDR2 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de IRLKXDXYAT (SEC ID nº: 456), en la que X en la posición 5 es S y X en la posición 7 es N;

(iii) una CDR3 de HC que comprende la secuencia de aminoácidos de XDGPPSGX (SEC ID nº: 457), en la que X en la posición 1 es N y X en la posición 8 es S;

(iv) una CDR1 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de EXIYSY (SEC ID nº: 476), en la que X es N;

(v) una CDR2 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de XAK (SEC ID nº: 477), en la que X en la posición 1 es N; y

(vi) una CDR3 de LC que comprende la secuencia de aminoácidos de QXHYXVPWT (SEC ID nº: 454), en la que X en la posición 2 es H y X en la posición 5 es T; y

(b) una proteína de unión a antígeno que comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de cadena pesada (HC) de SEC ID nº: 23, 24 y 25, y las secuencias de aminoácidos de CDR1-3 de cadena ligera (LC) de SEC ID nº: 20, 21 y 22,

en el que el conector está entre el anticuerpo y el agente citotóxico o agente quimioterápico y el conector es seleccionado de entre el grupo que consiste en VC-PAB, GGFG y CL2A.

2. Conjugado según la reivindicación 1, en el que el conjugado comprende VC-PAB-MMAE.

3. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno.

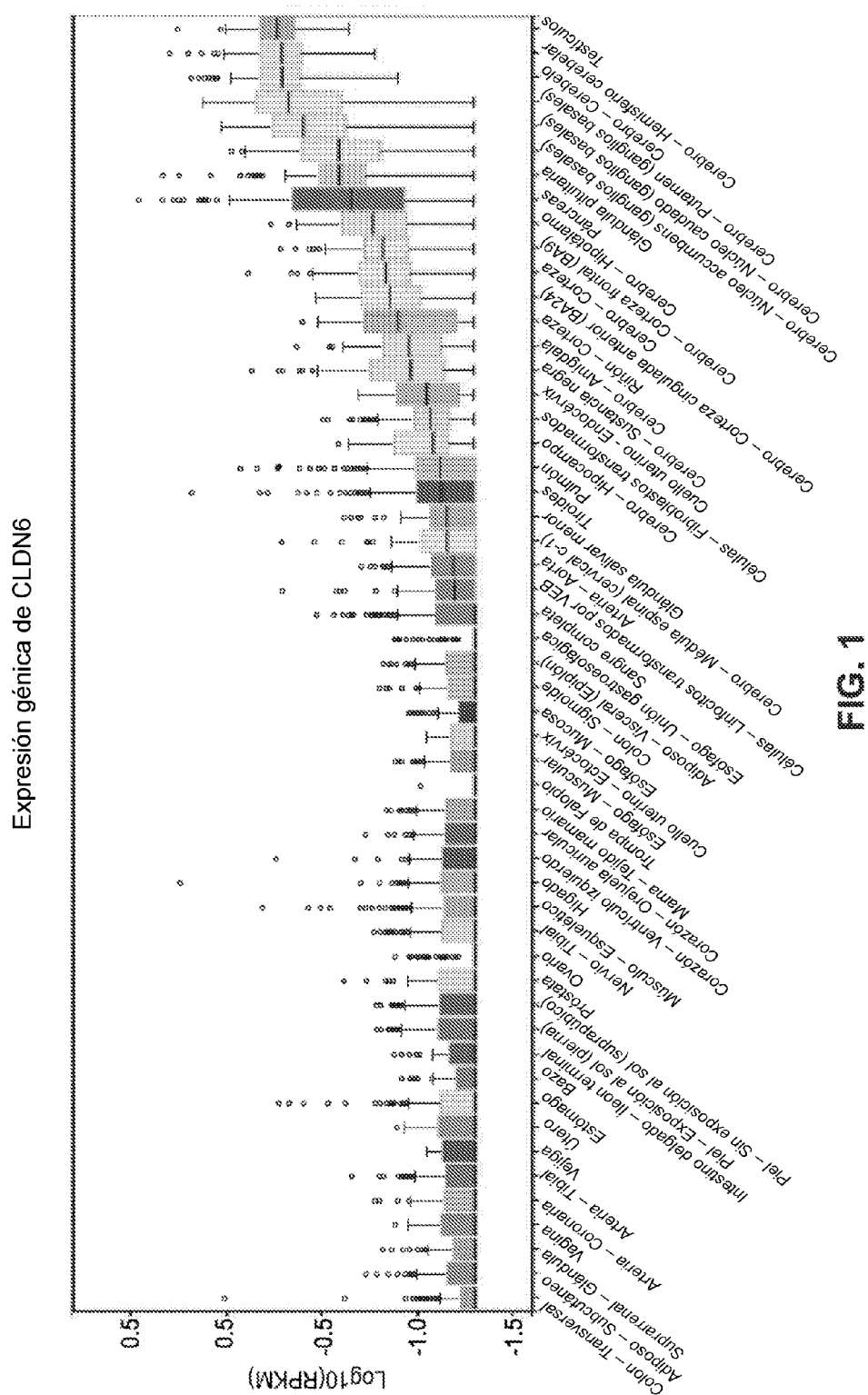
4. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína es un anticuerpo monoclonal.

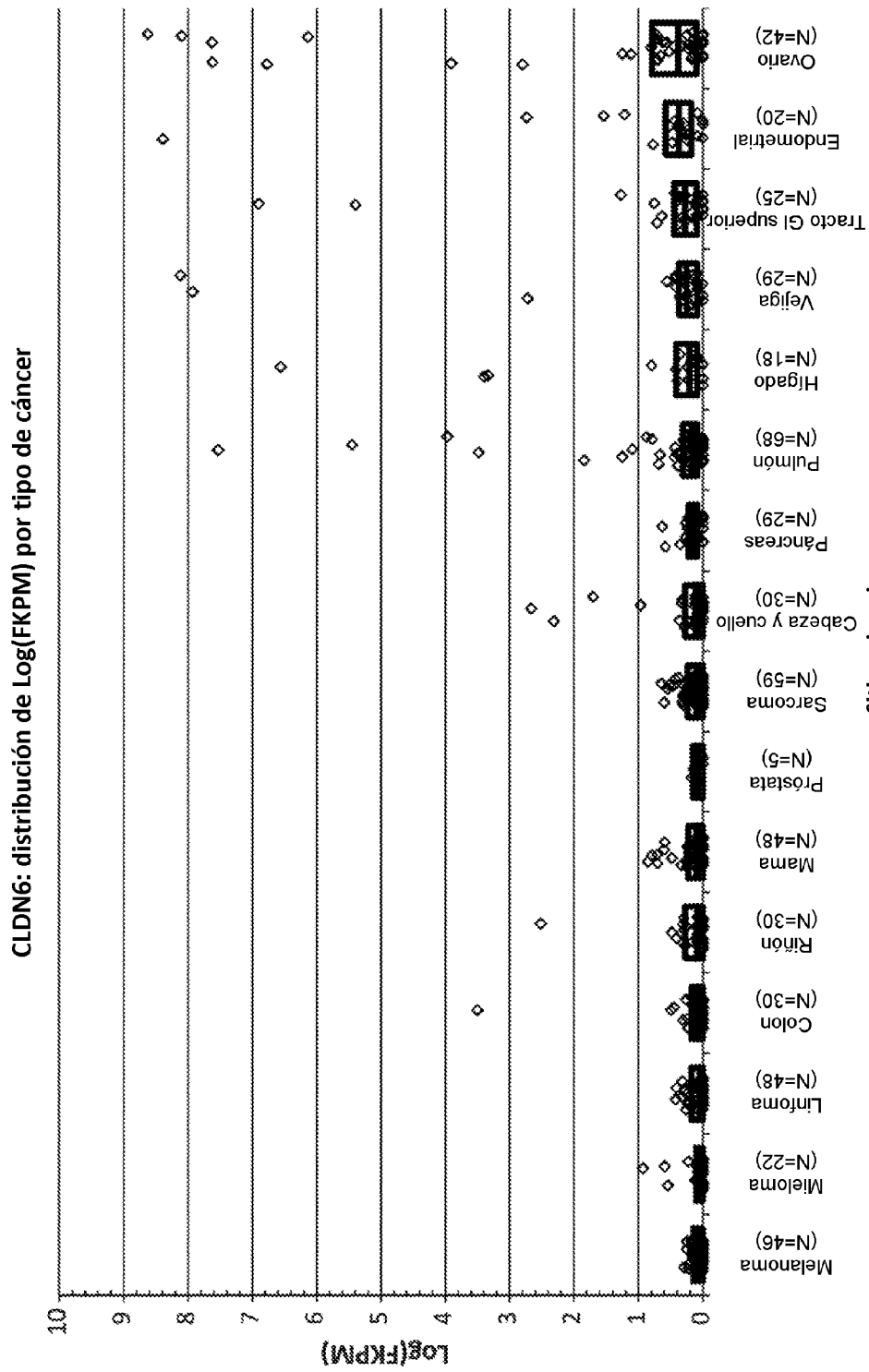
5. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína es un anticuerpo humano, quimérico o humanizado.

6. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína es un anticuerpo humanizado que comprende la secuencia de dominio variable de cadena pesada como se proporciona en SEC ID nº: 387 y la secuencia de dominio variable de cadena ligera como se proporciona en SEC ID nº: 389 o una variante que presenta una identidad de secuencia de por lo menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % a lo largo de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos a la que se hace referencia.

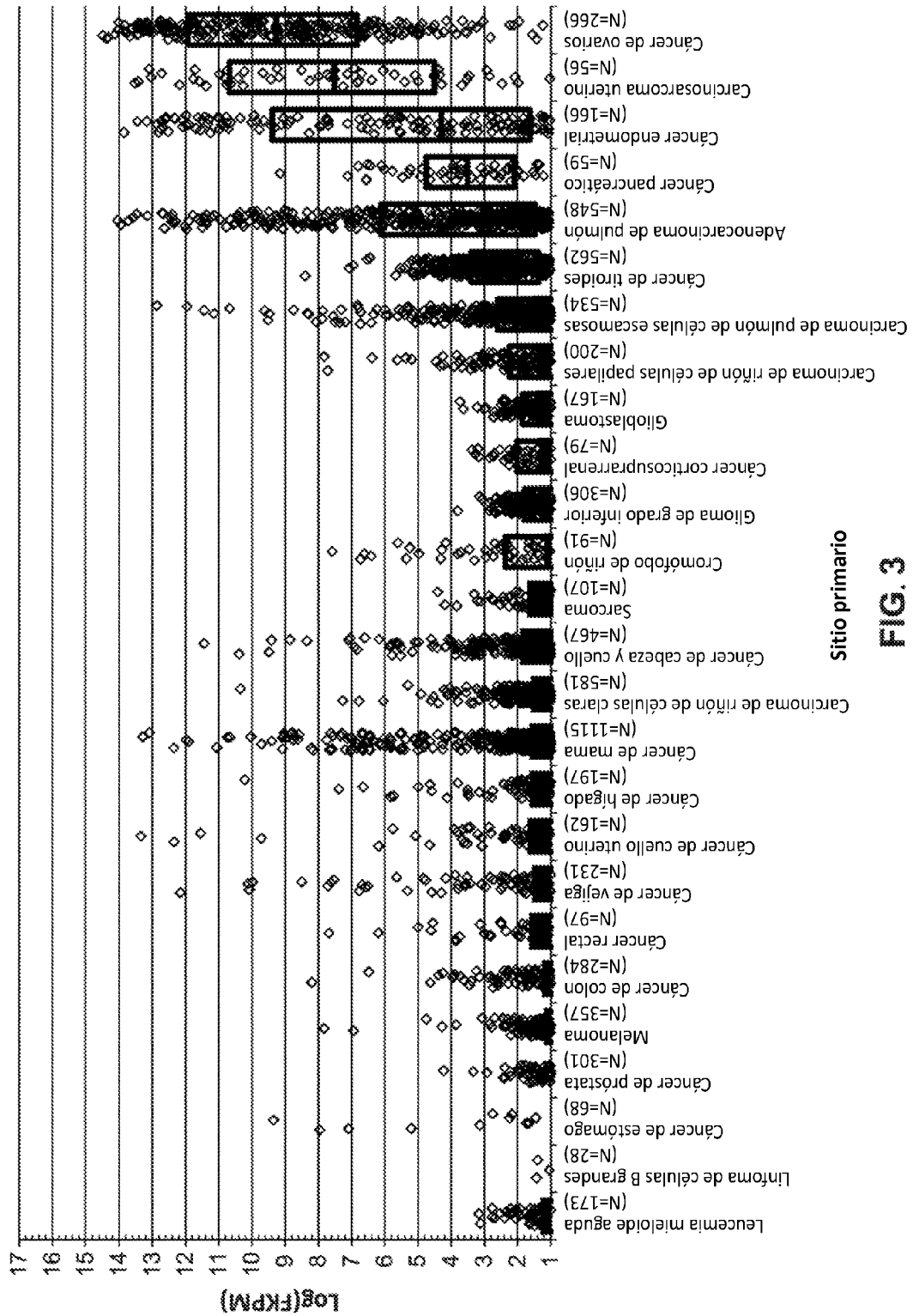
7. Composición farmacéutica que comprende un conjugado según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptables.

8. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o composición farmacéutica según la reivindicación 7 para la utilización en tratar el cáncer, inhibir el crecimiento tumoral, reducir el tamaño tumoral o prevenir la recidiva del cáncer.





Sitio primario
FIG. 2



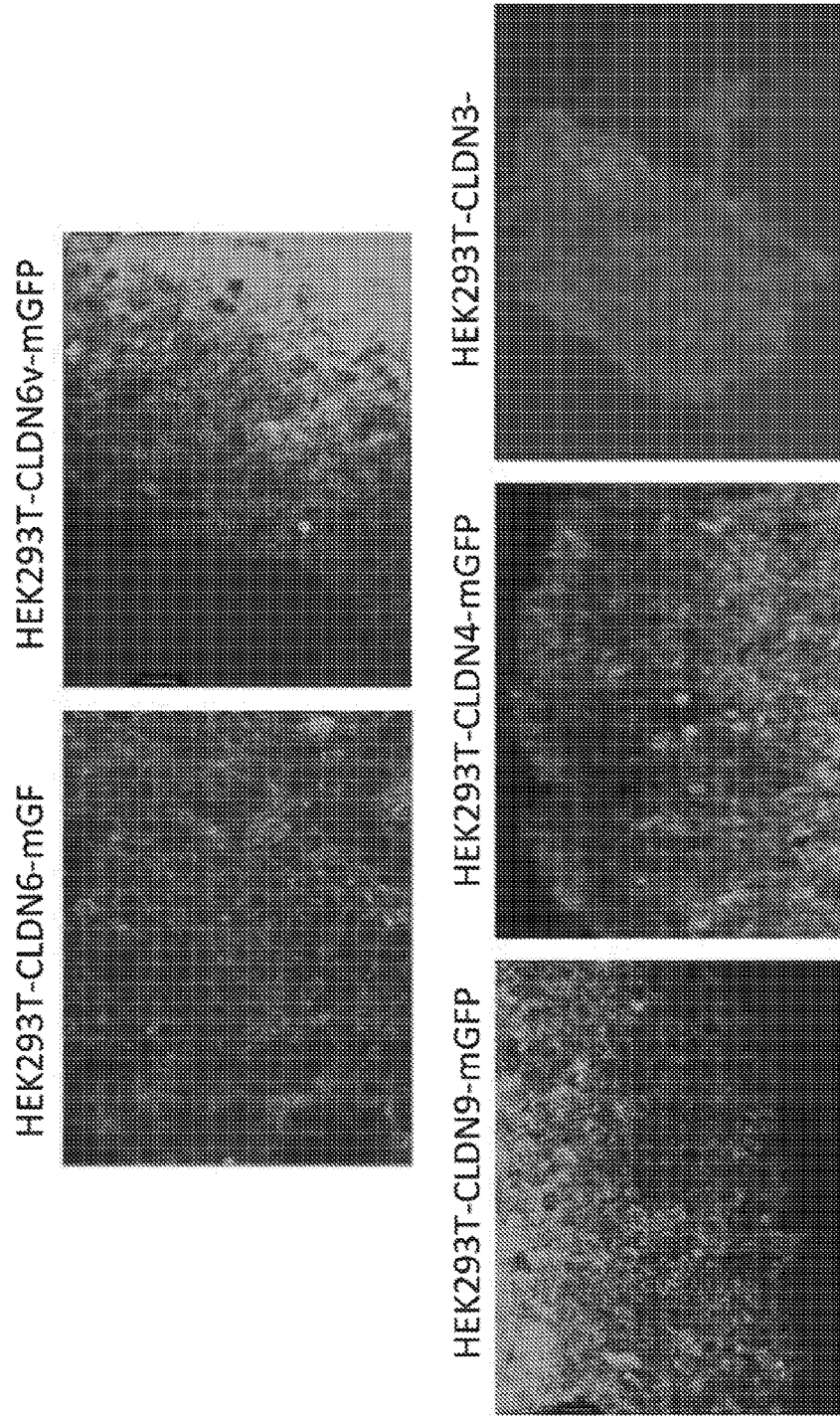


FIG. 4

FIG. 5

Crystal O(1.2.1) alineación de múltiples secuencias

[illegible]

ECD Loop 1	SEC ID NO:177
ECD Loop 2	SEC ID NO:2

CLD6_HUMAN=SEC ID NO:1
CLD3_HUMAN=SEC ID NO:5
CLD4_HUMAN=SEC ID NO:6
CLD9_HUMAN=SEC ID NO:7
CLD6_MOUSE=SEC ID NO:176

FIG. 6A

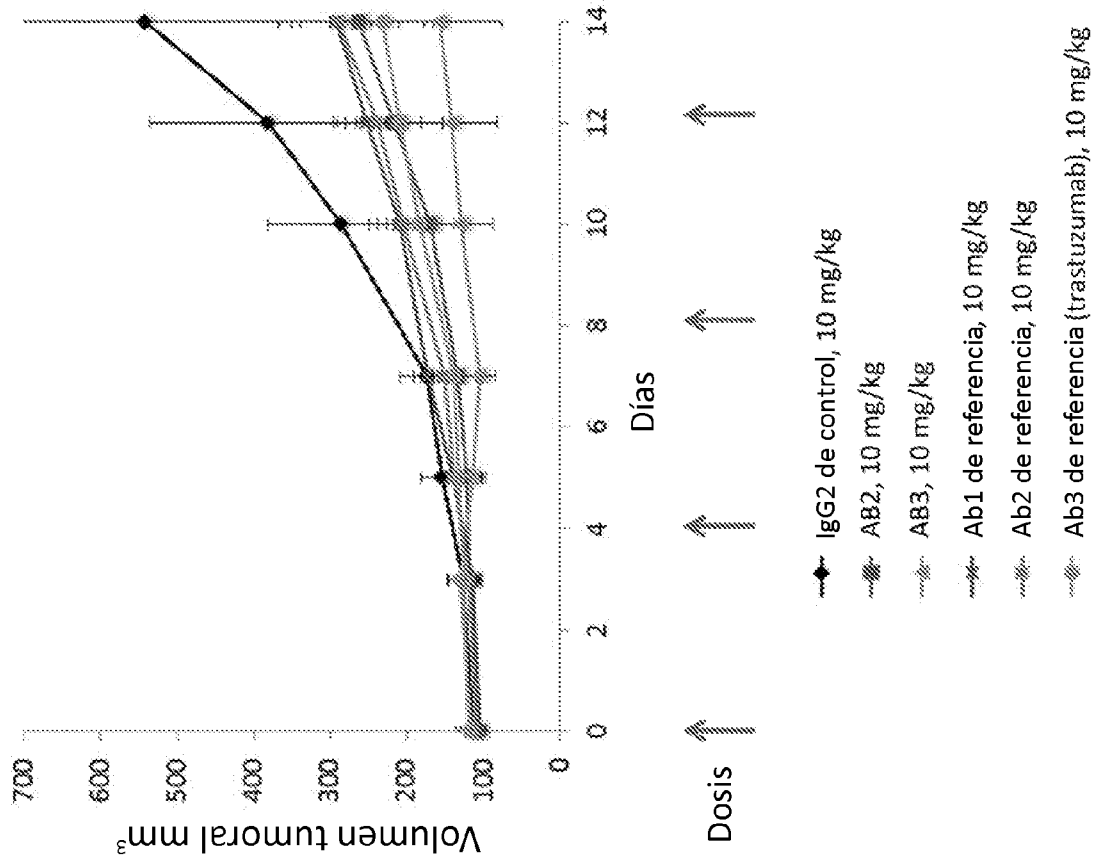


FIG. 6B

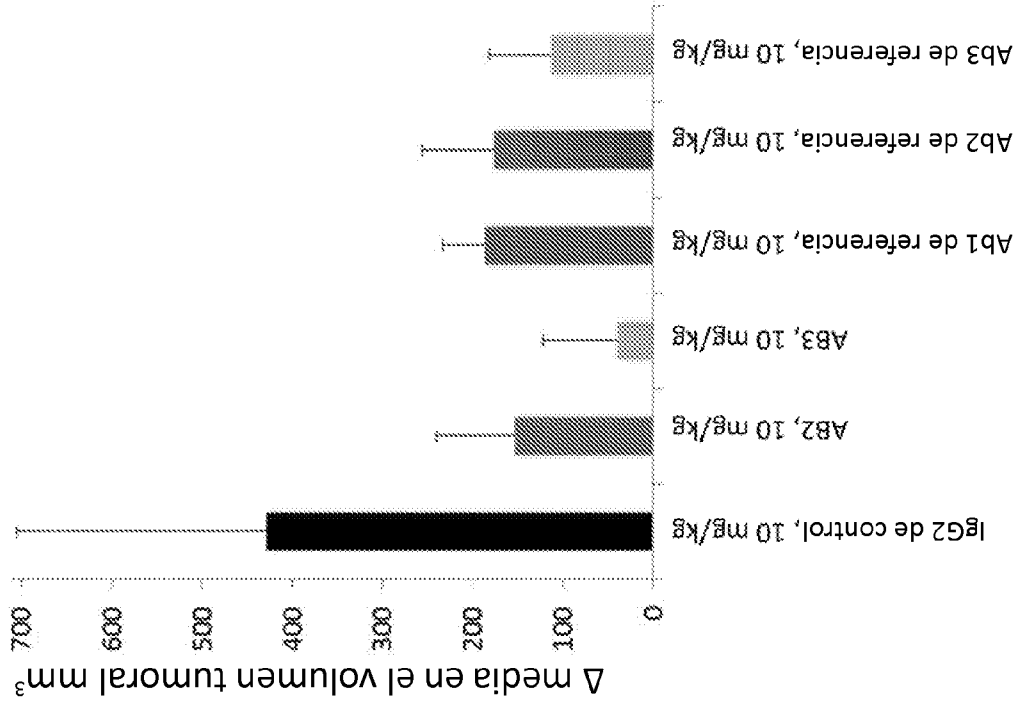


FIG. 7B

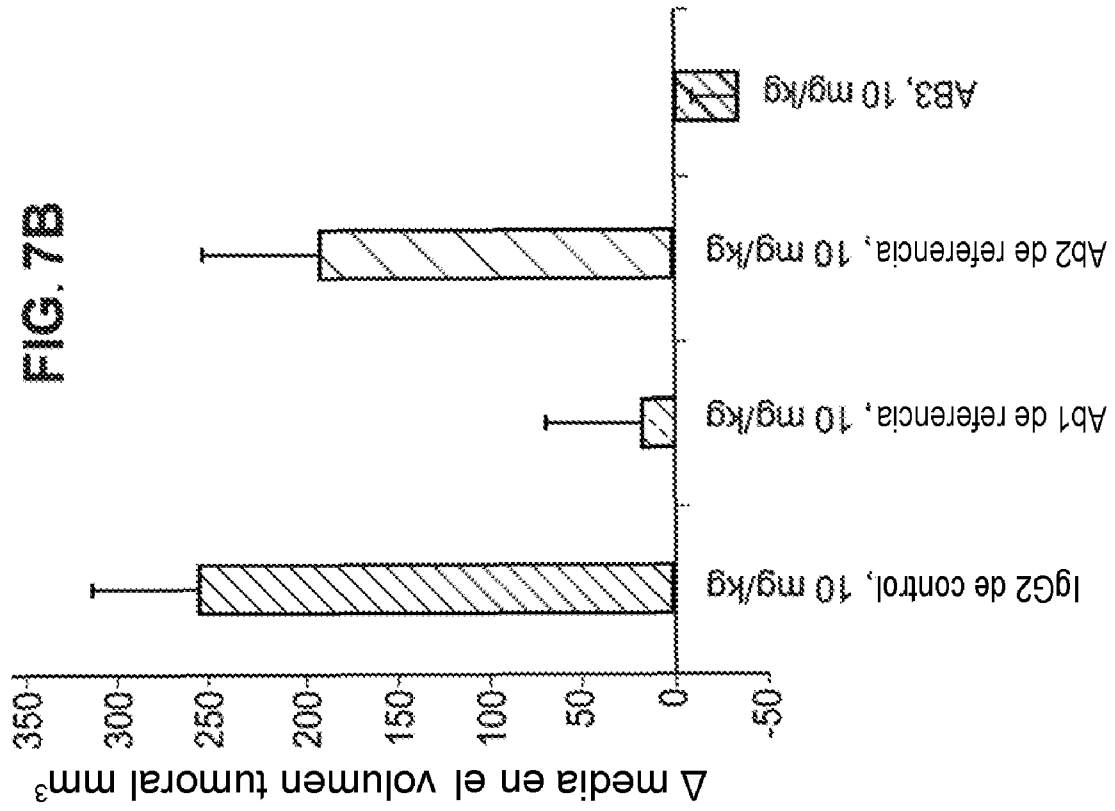
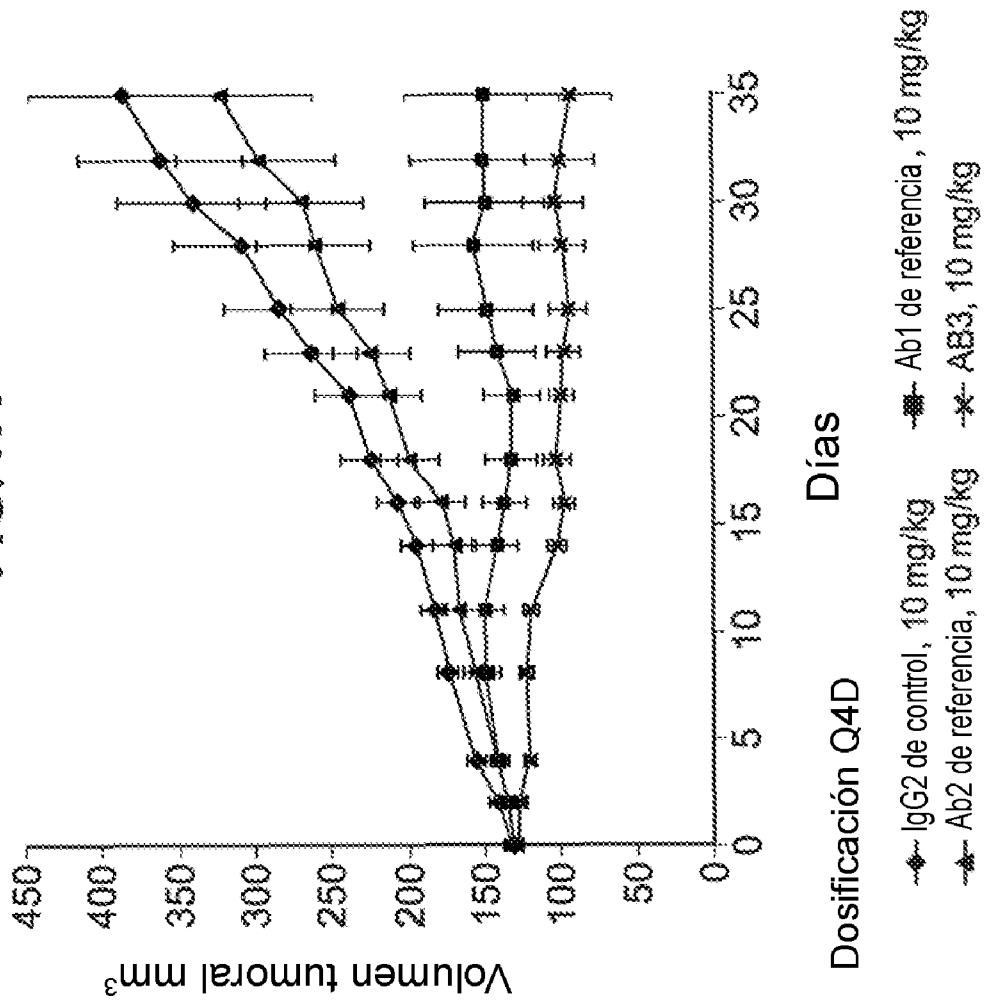
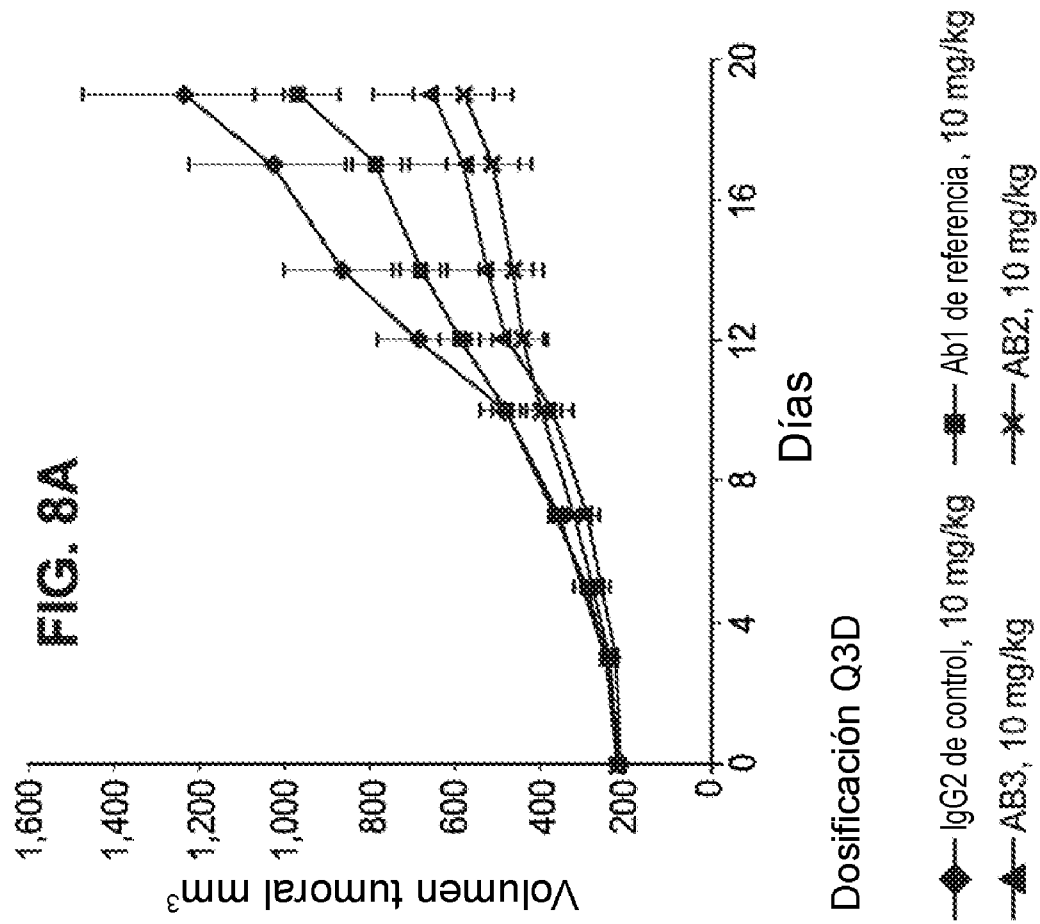
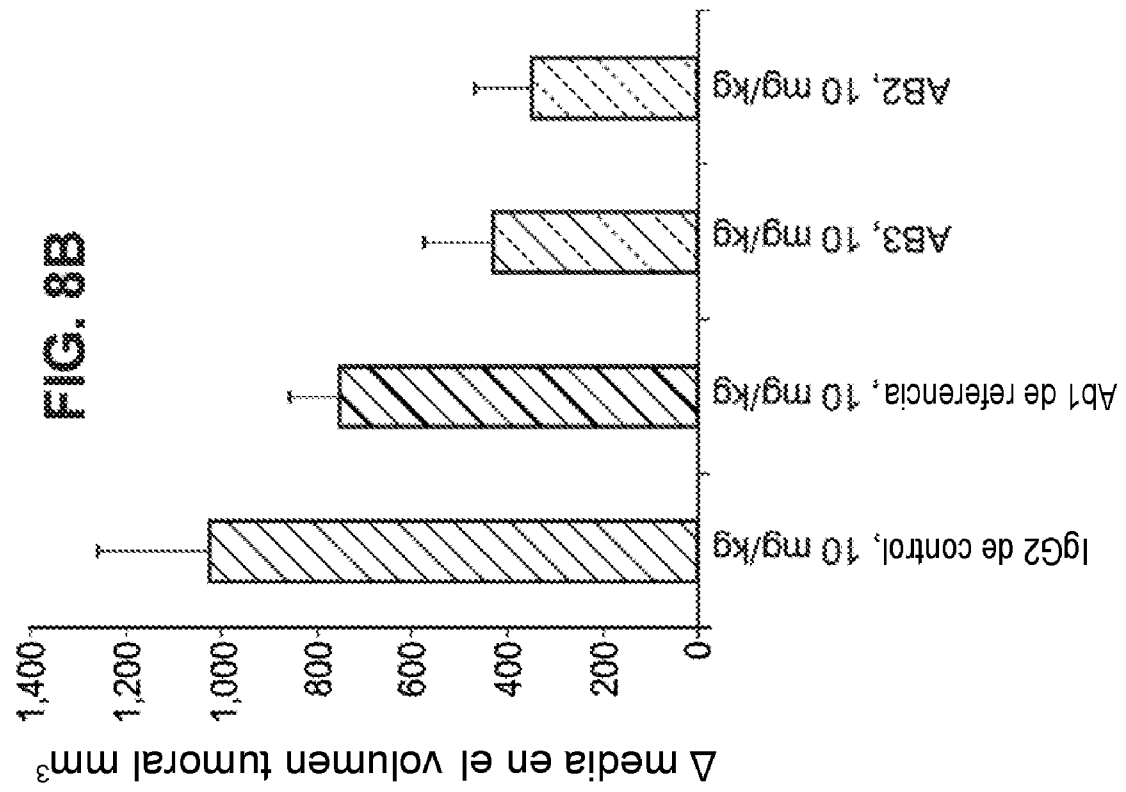


FIG. 7A





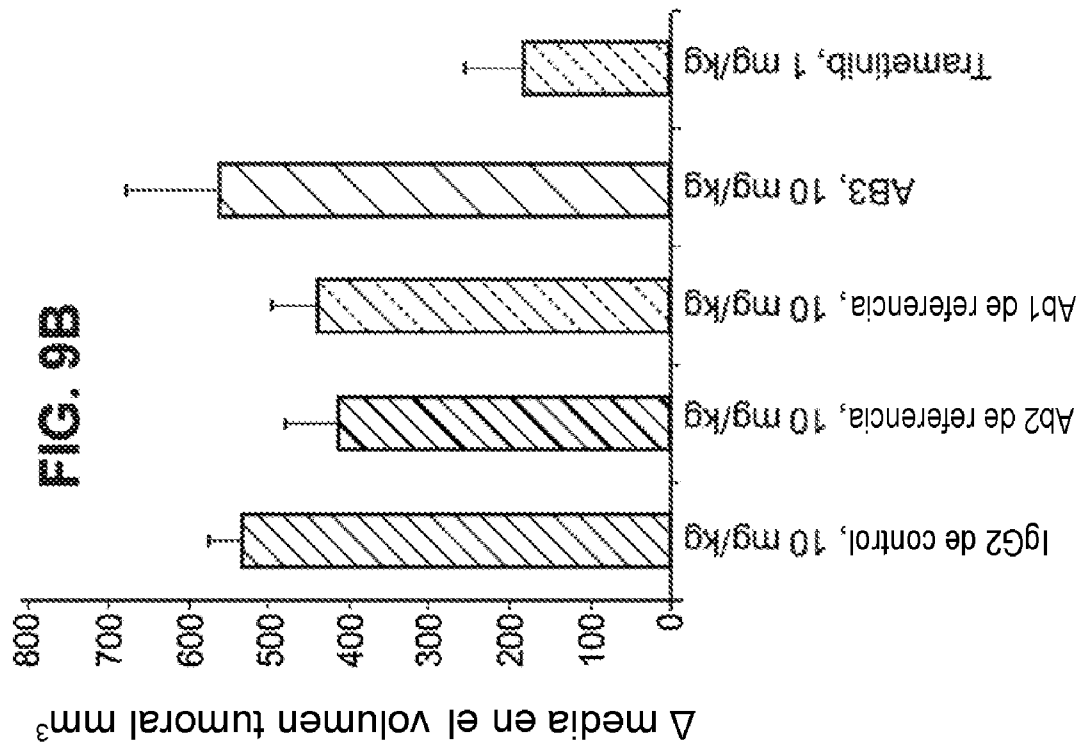
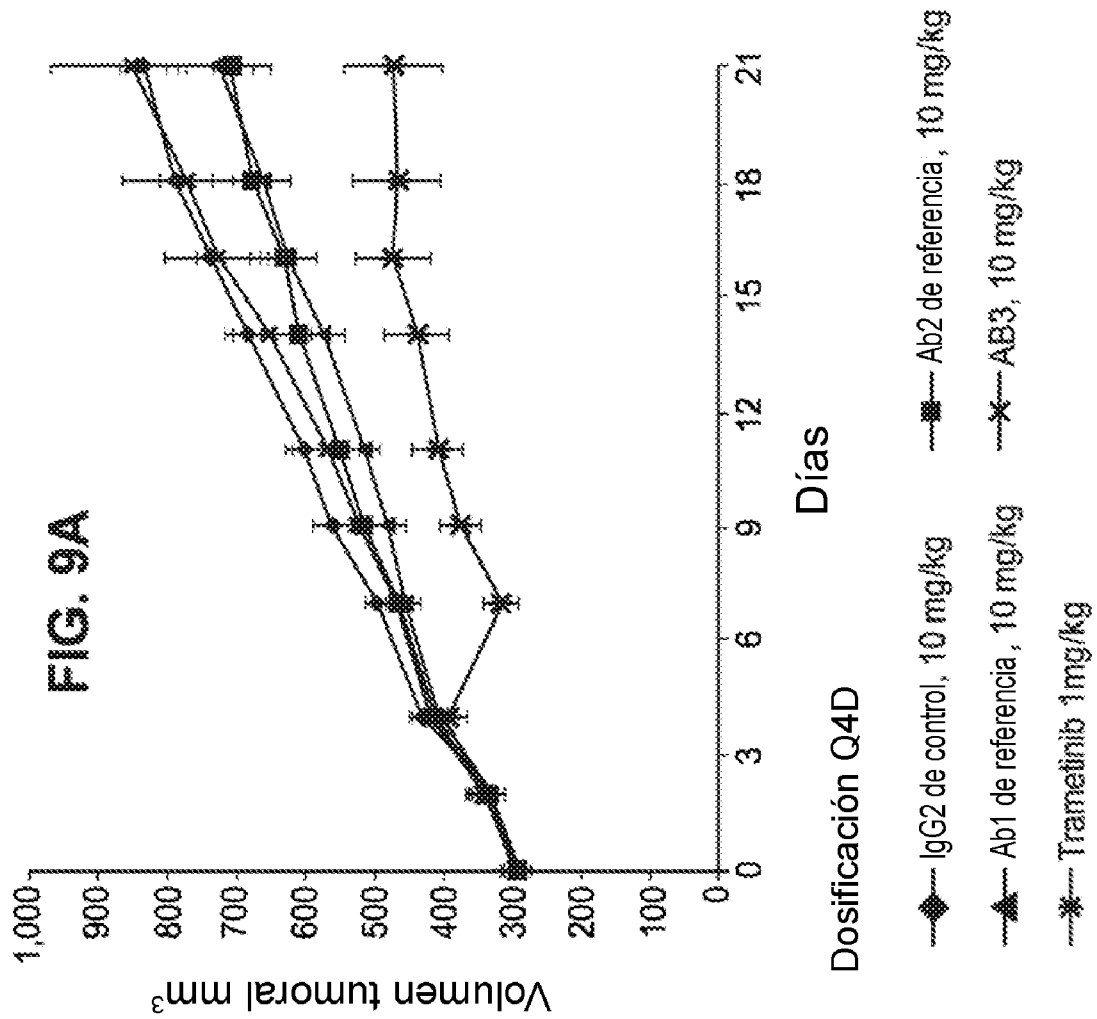


FIG. 10A

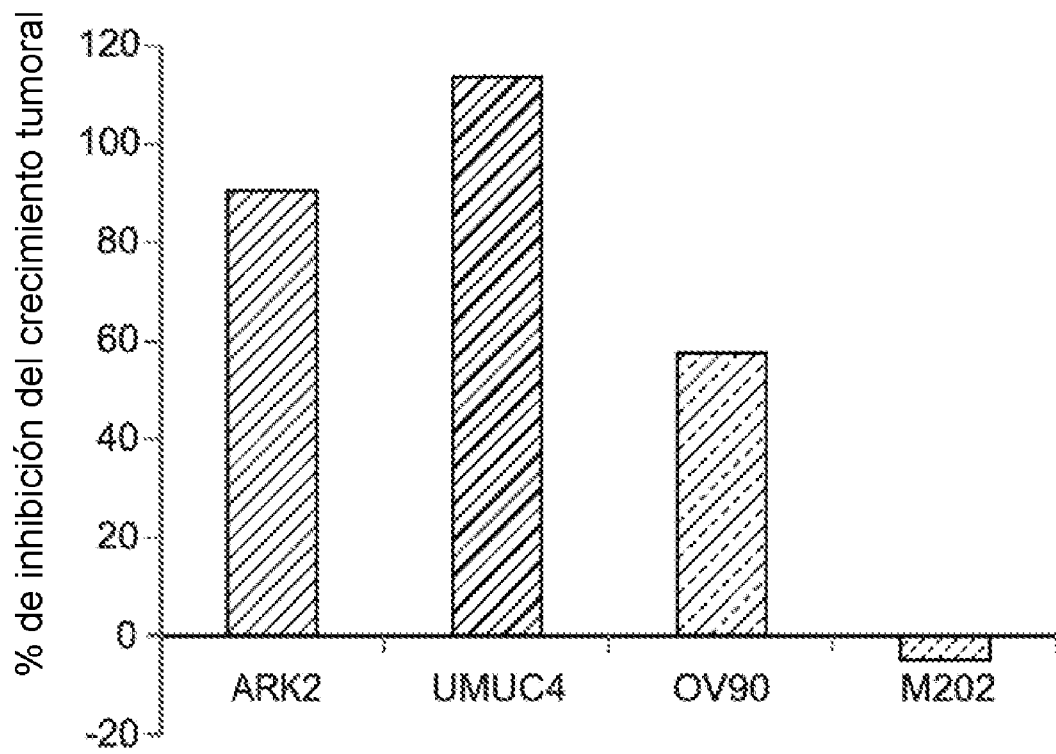
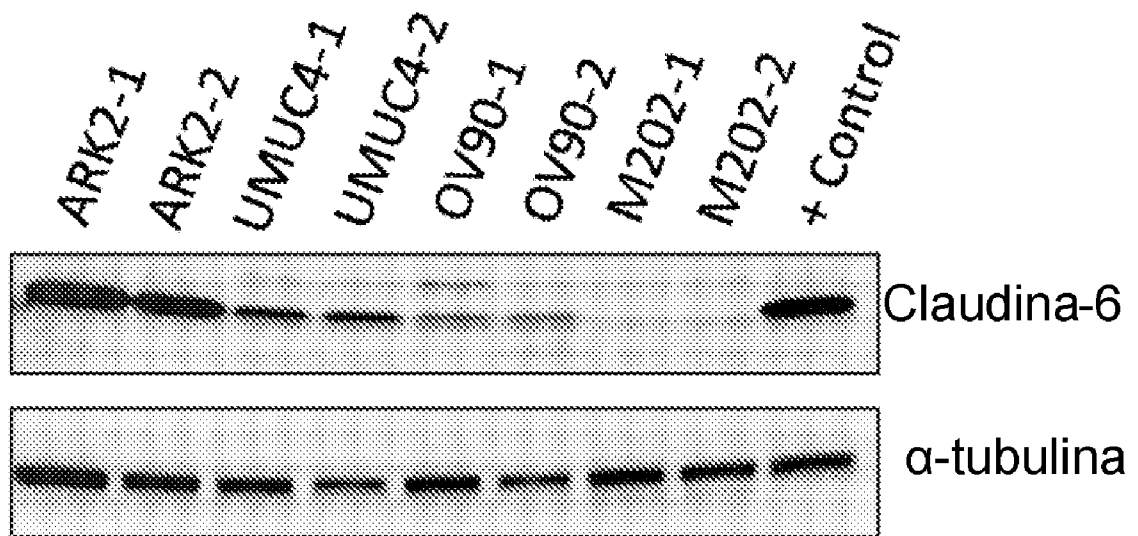
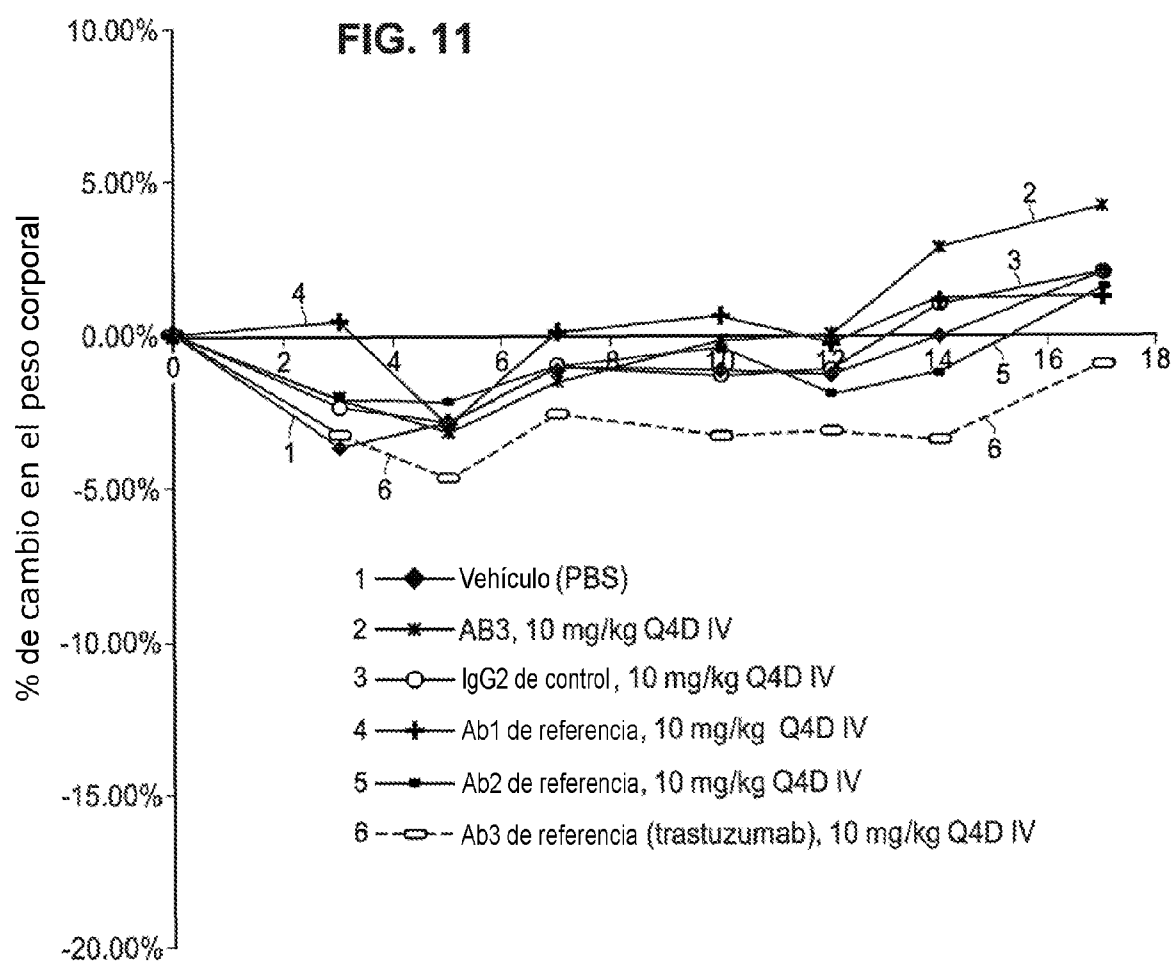
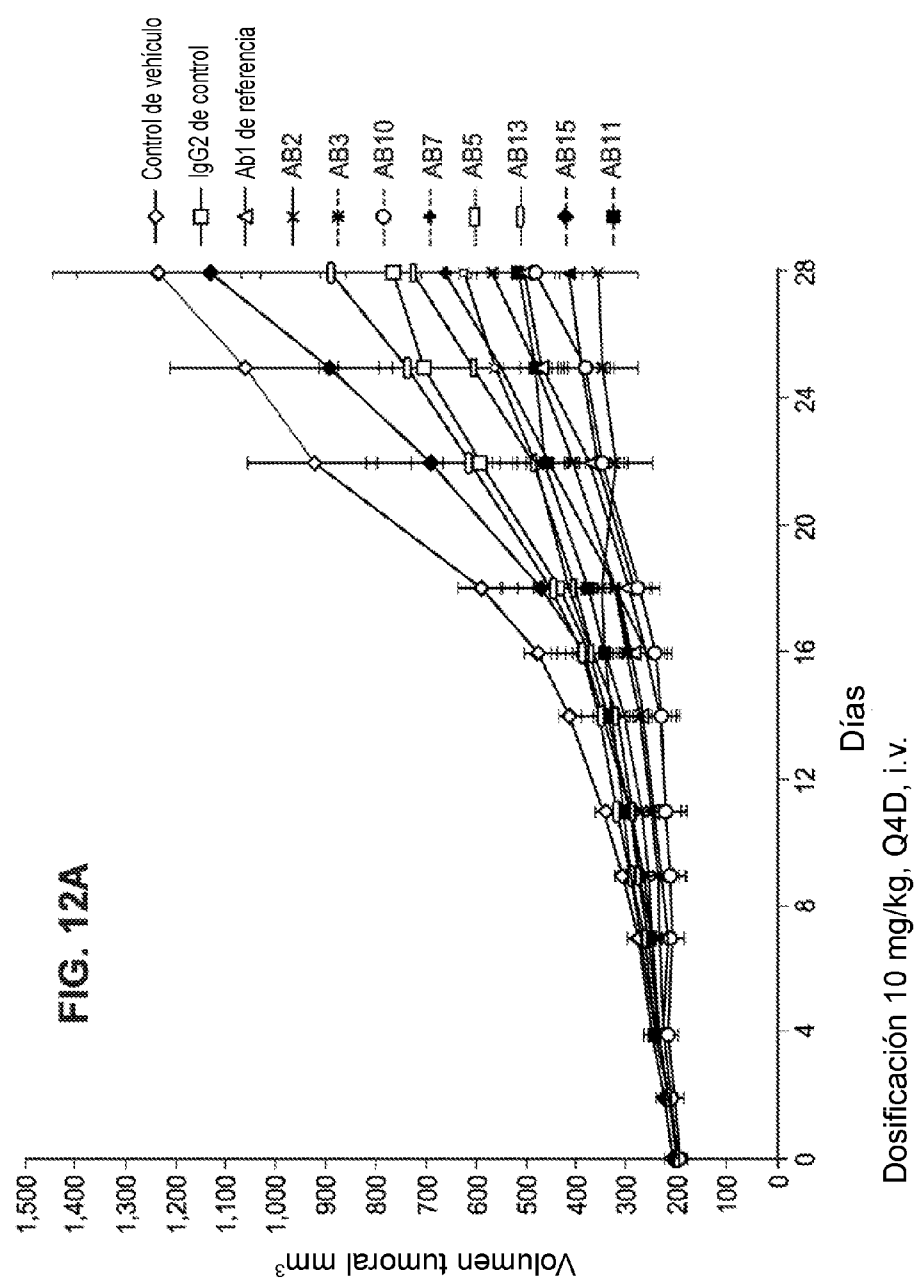
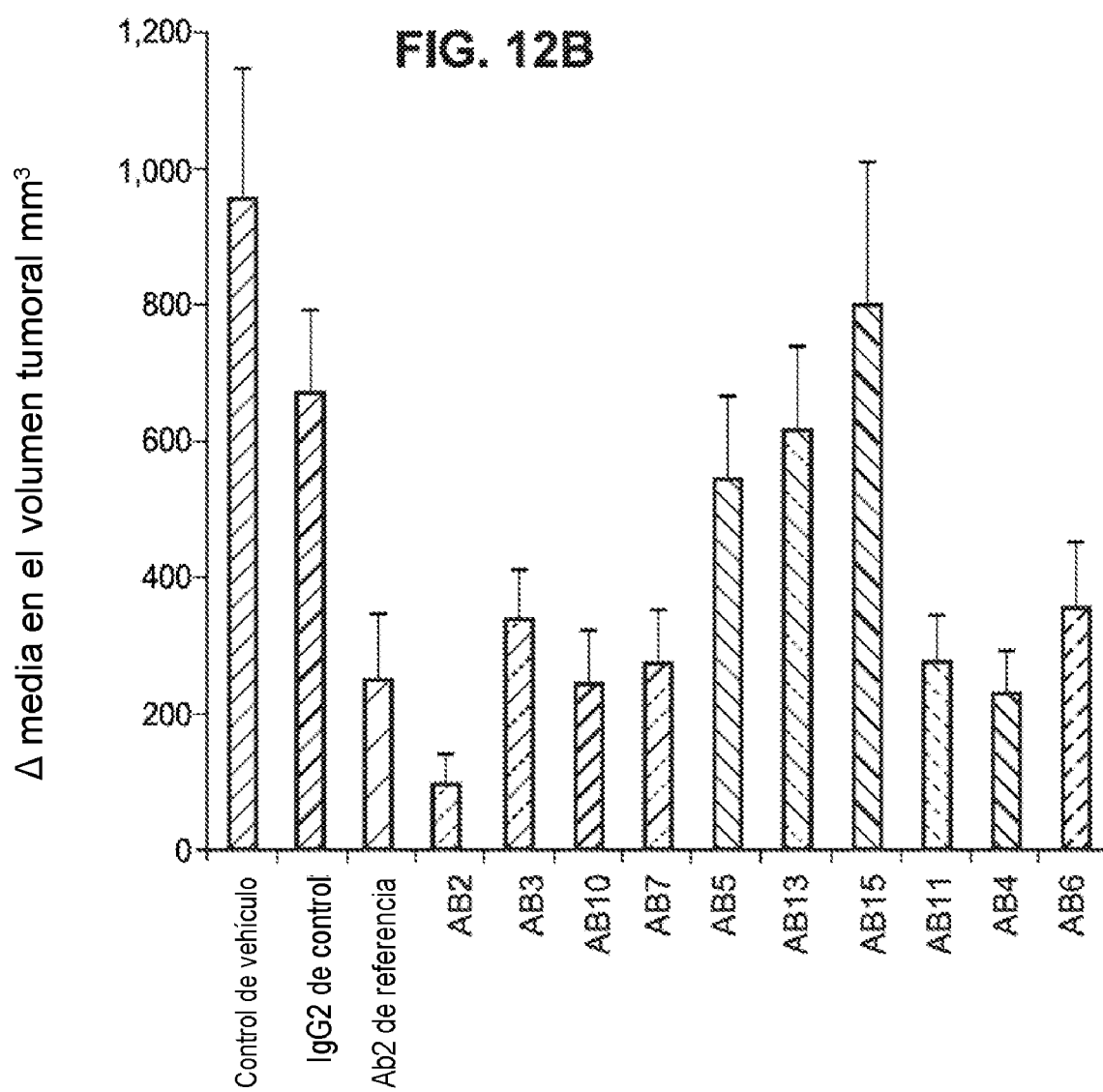


FIG. 10B









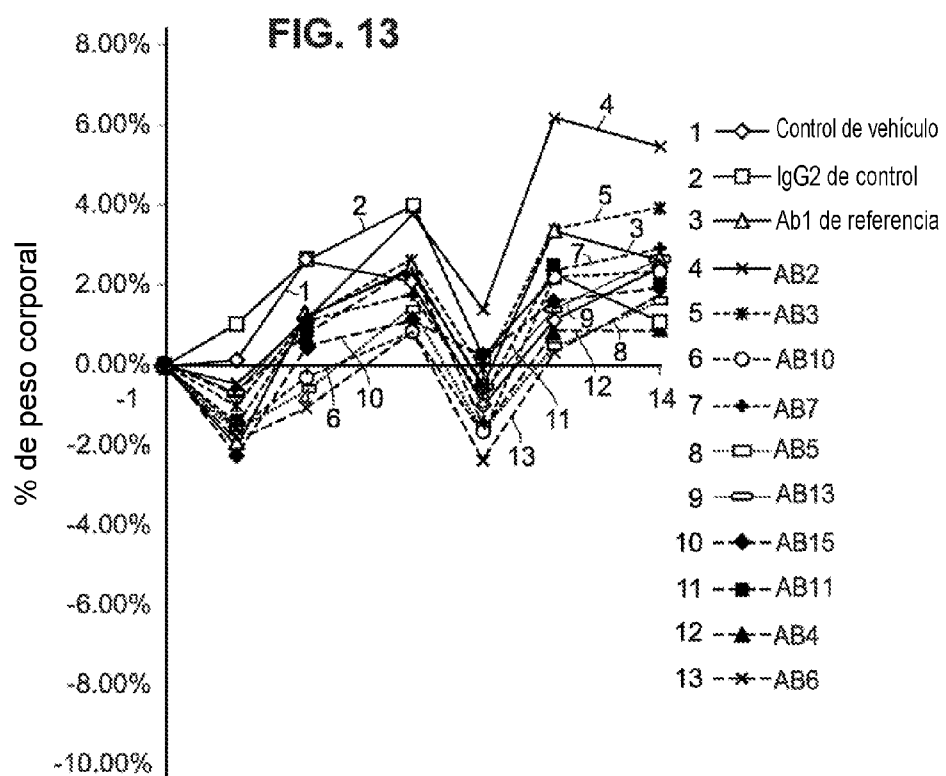
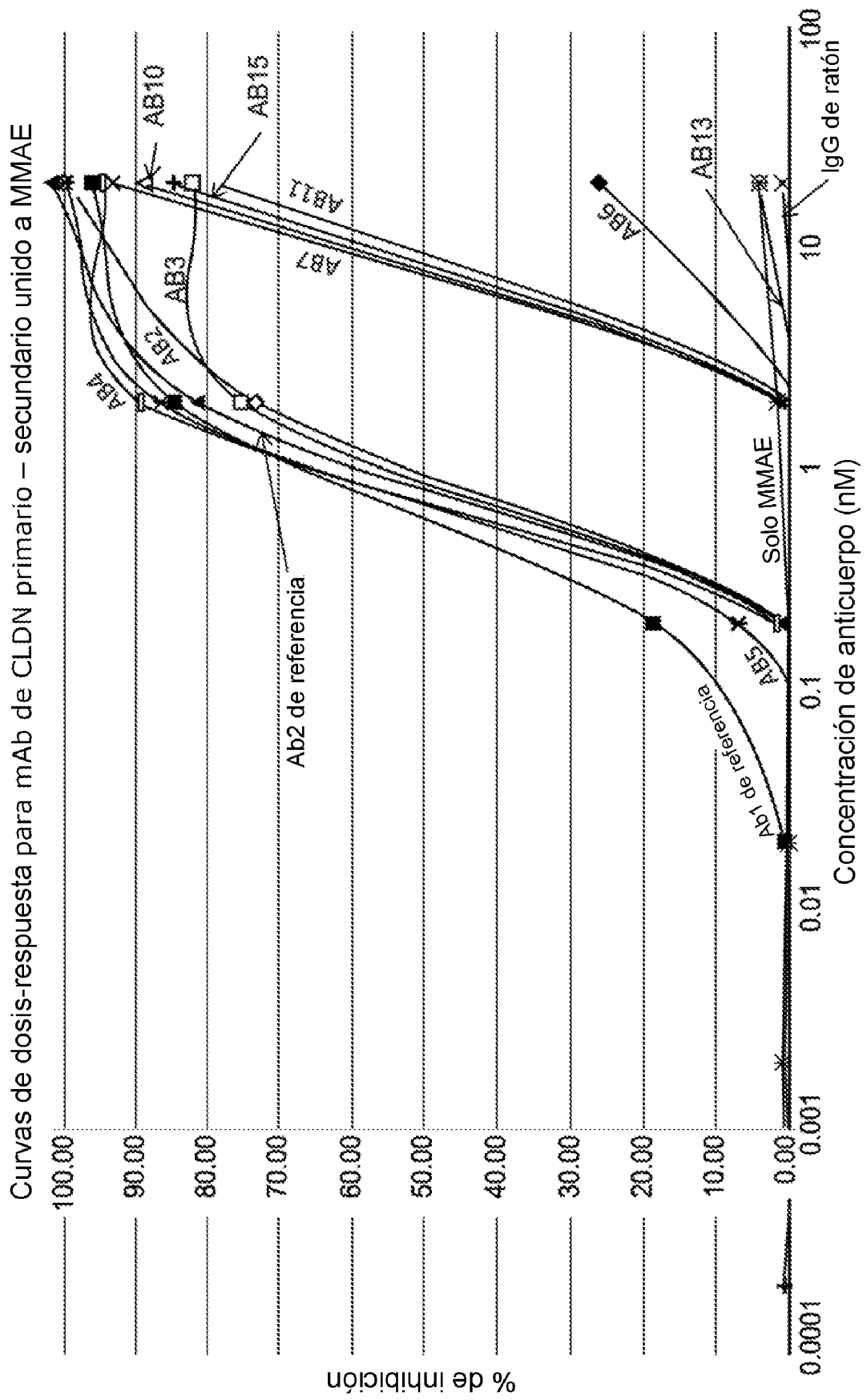
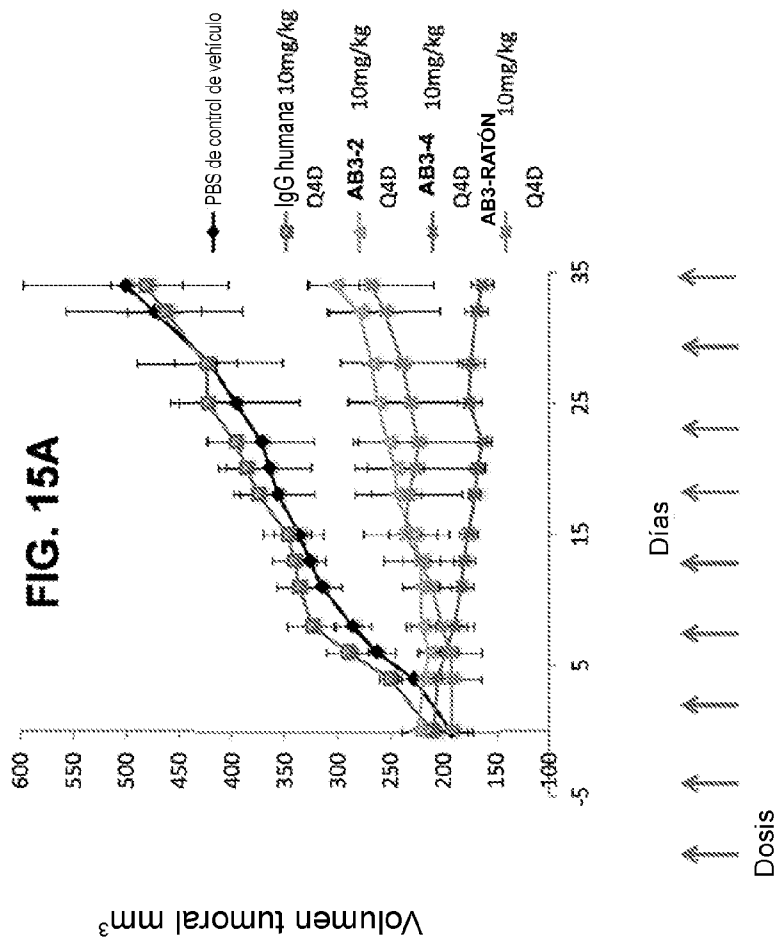
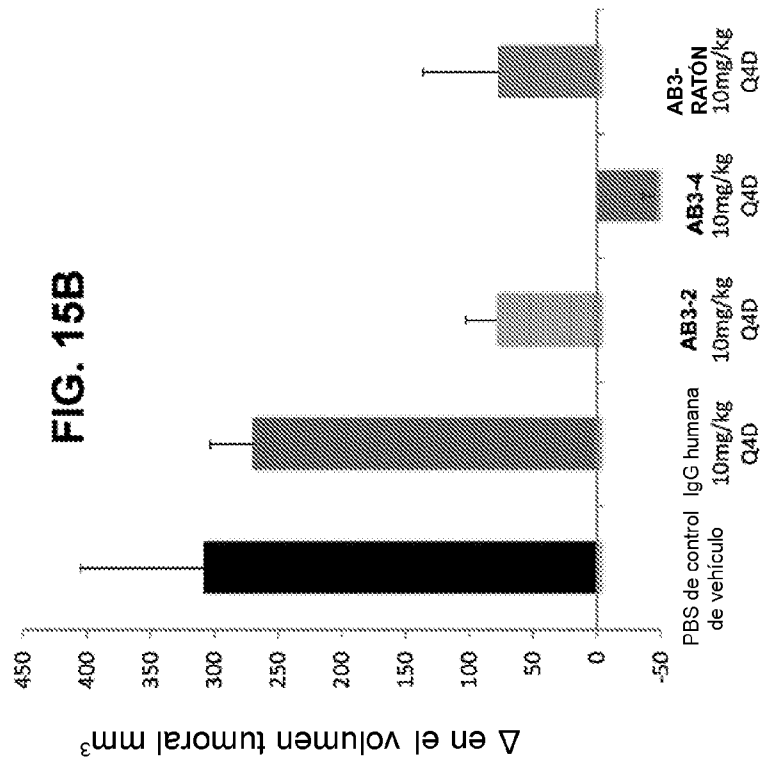
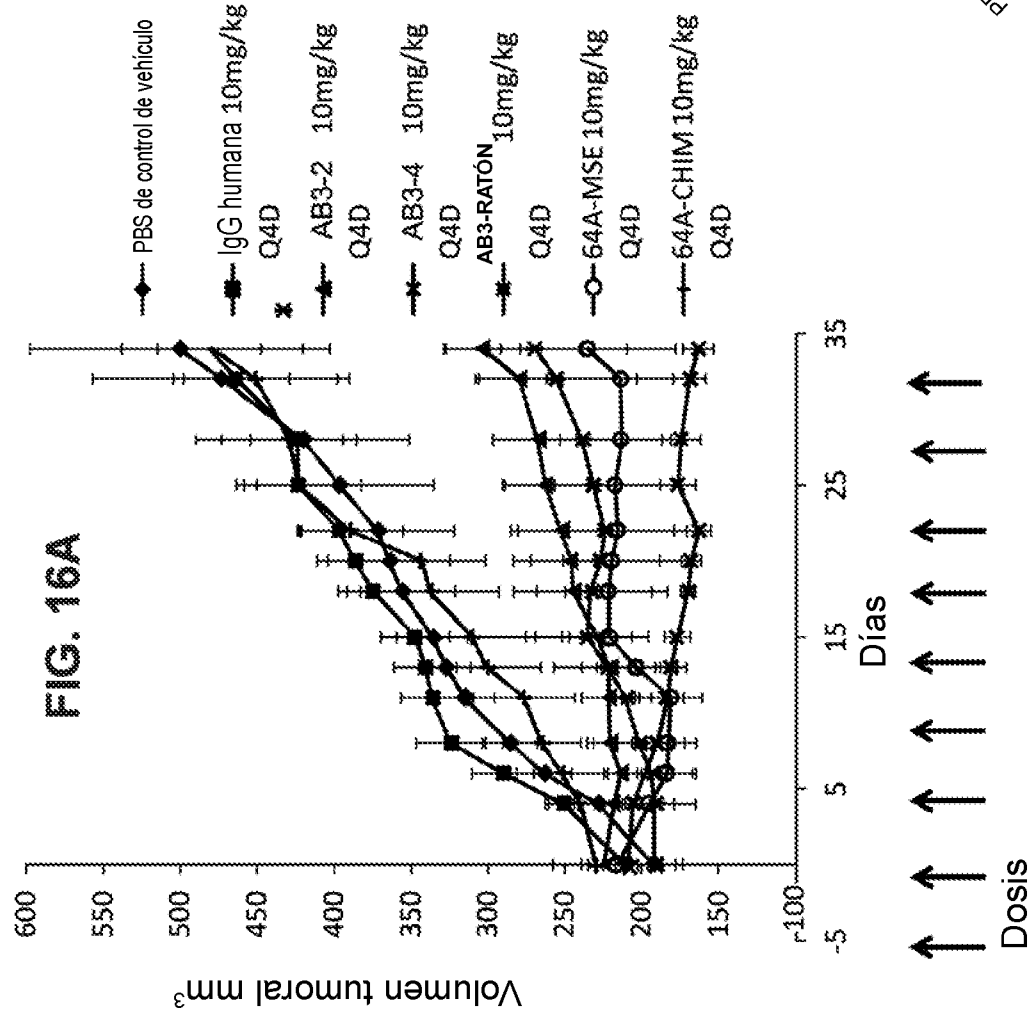
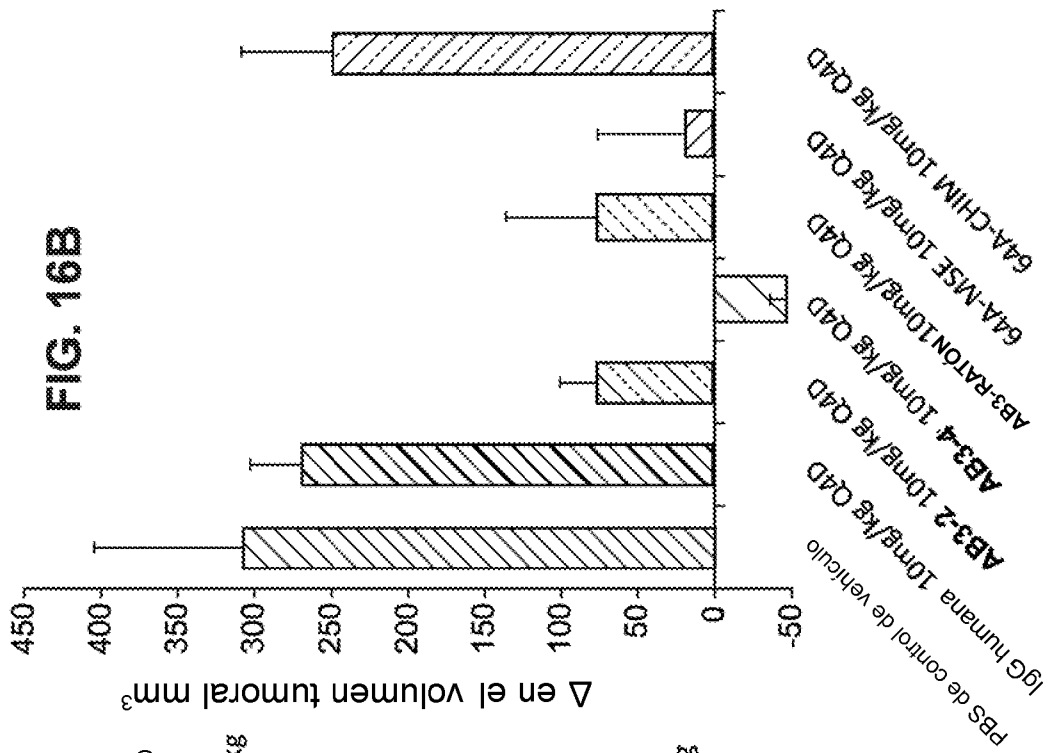
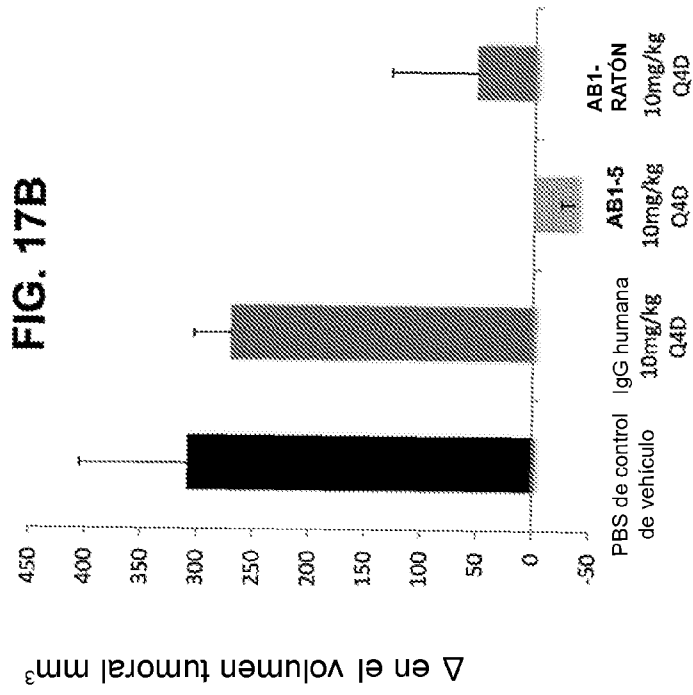
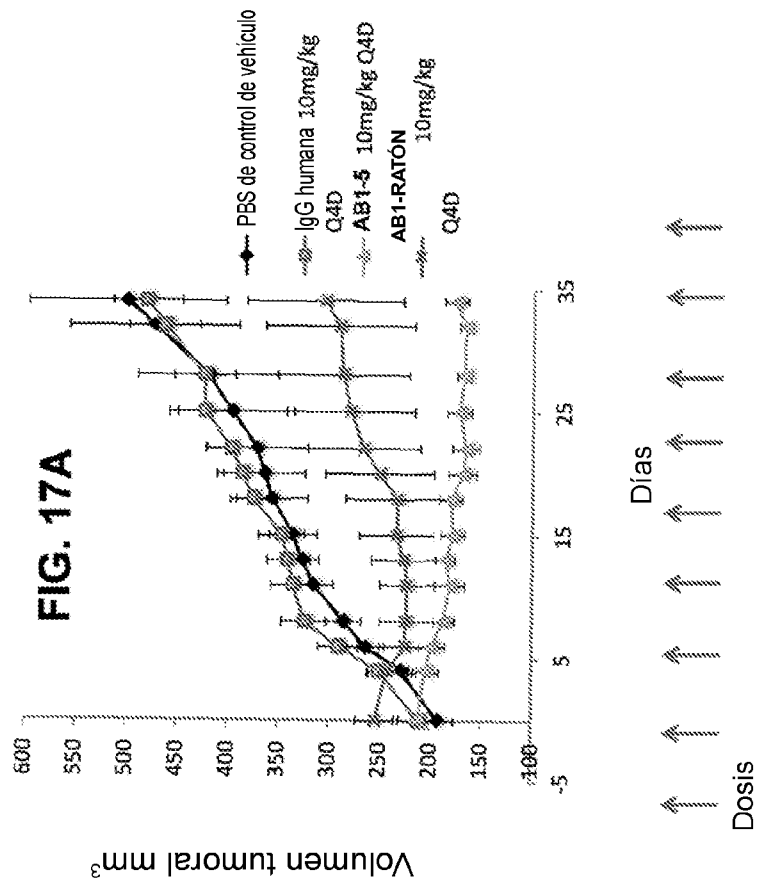


FIG. 14









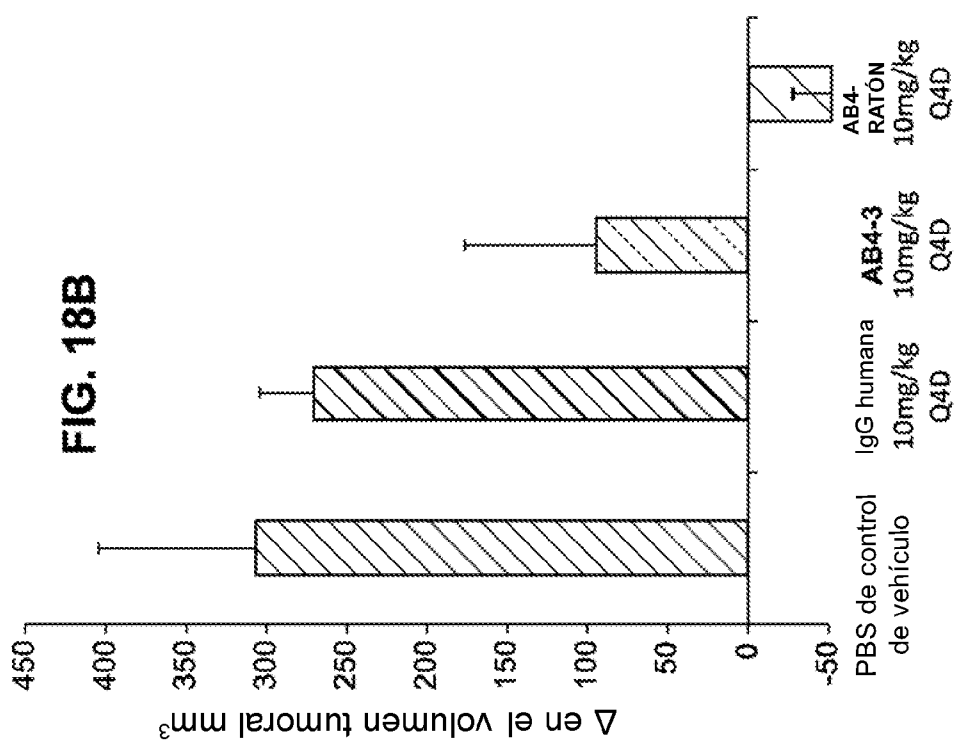


FIGURA 18B

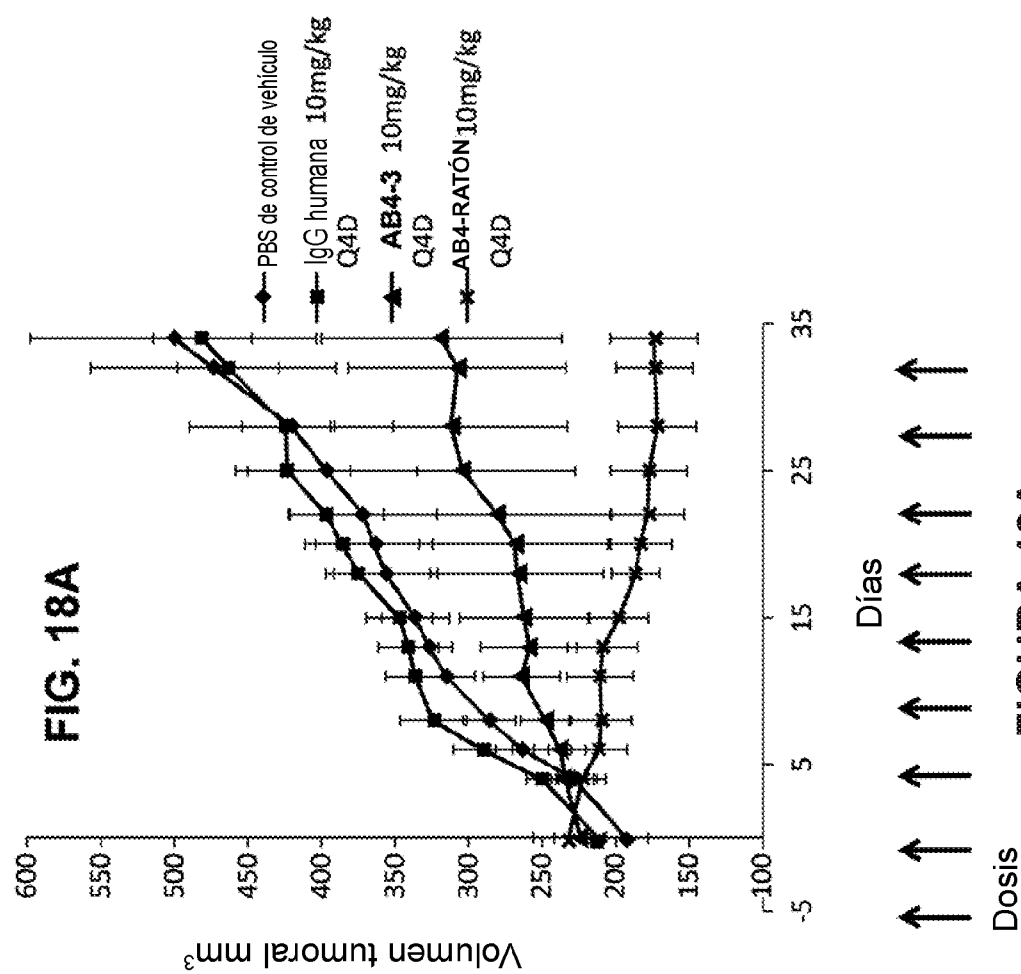
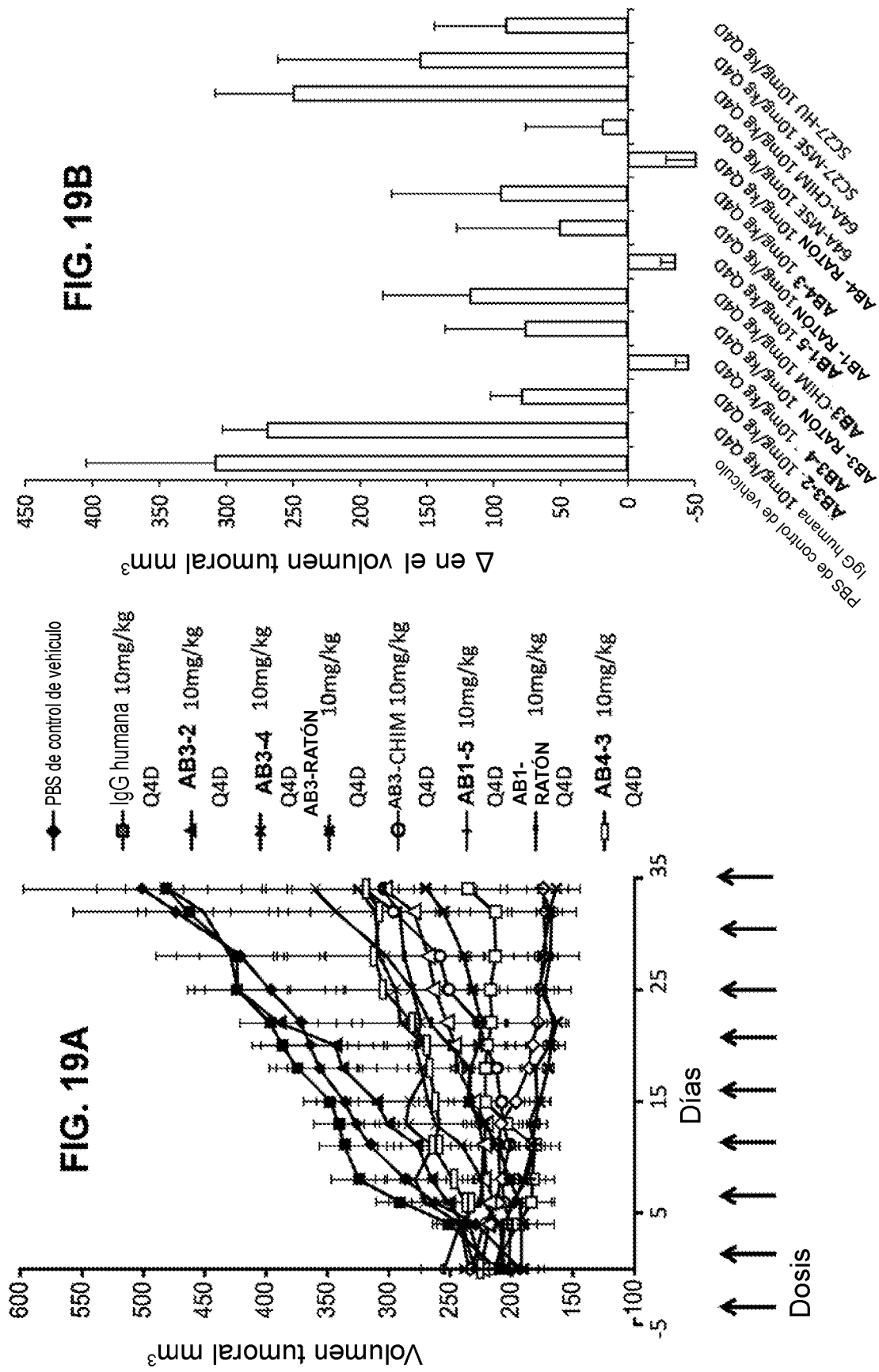


FIGURA 18A



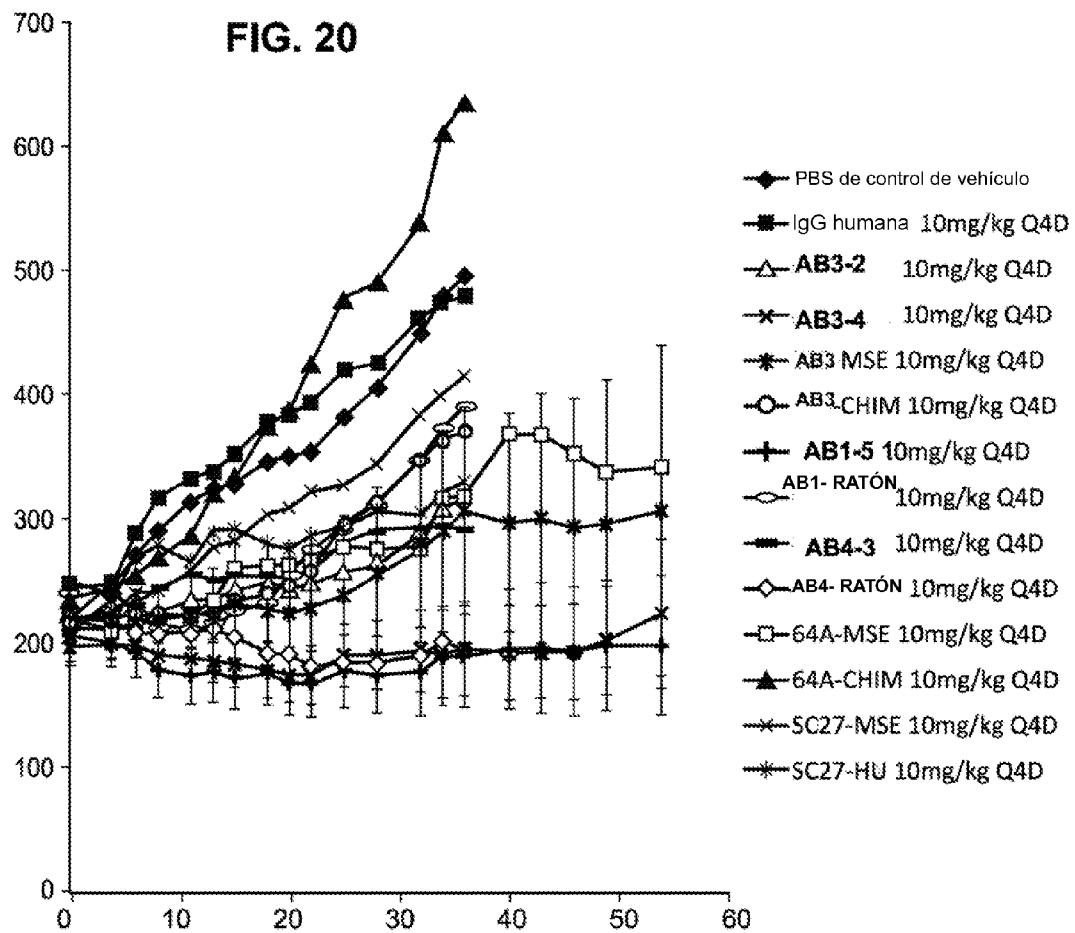


FIGURA 20

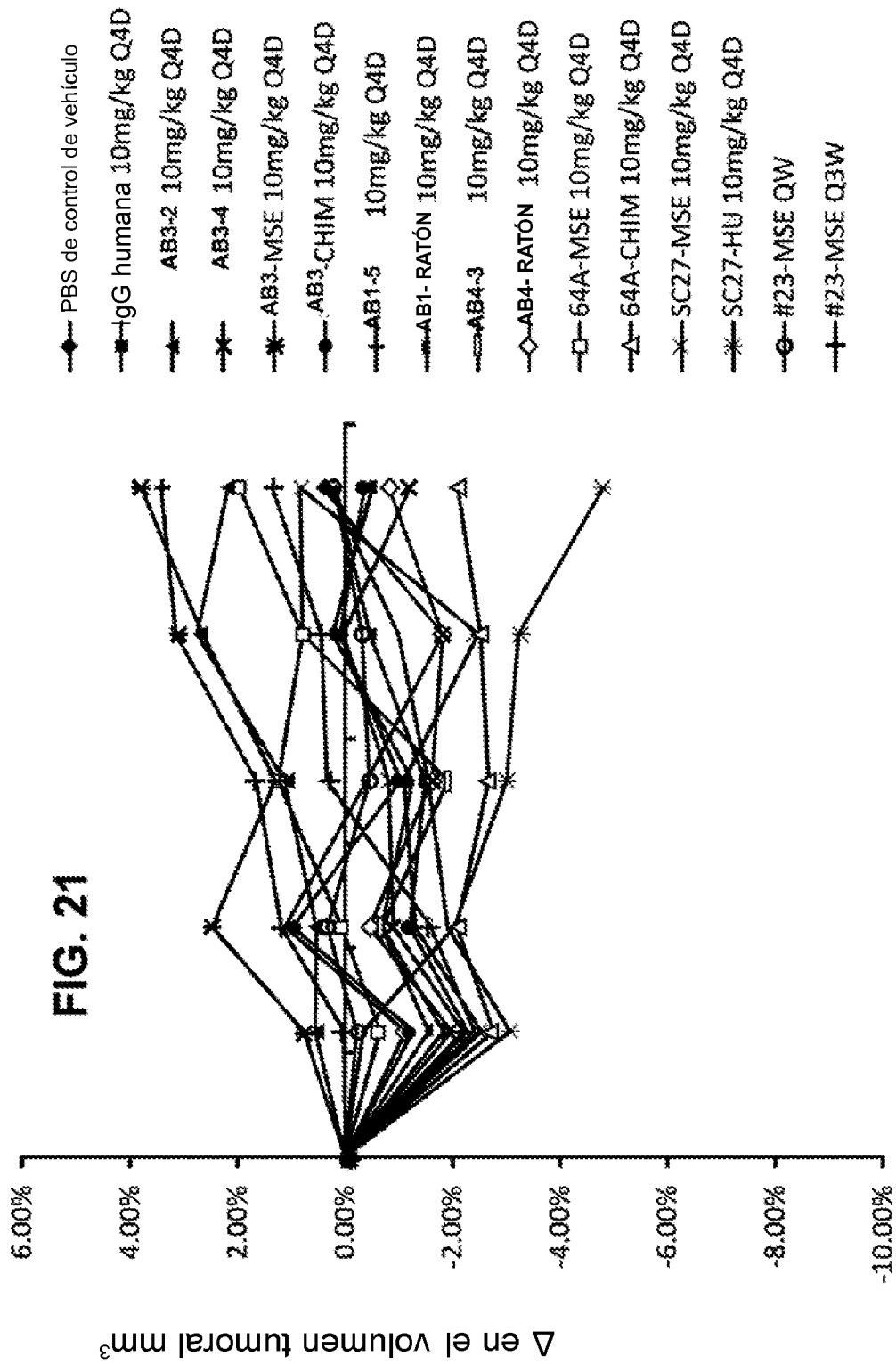
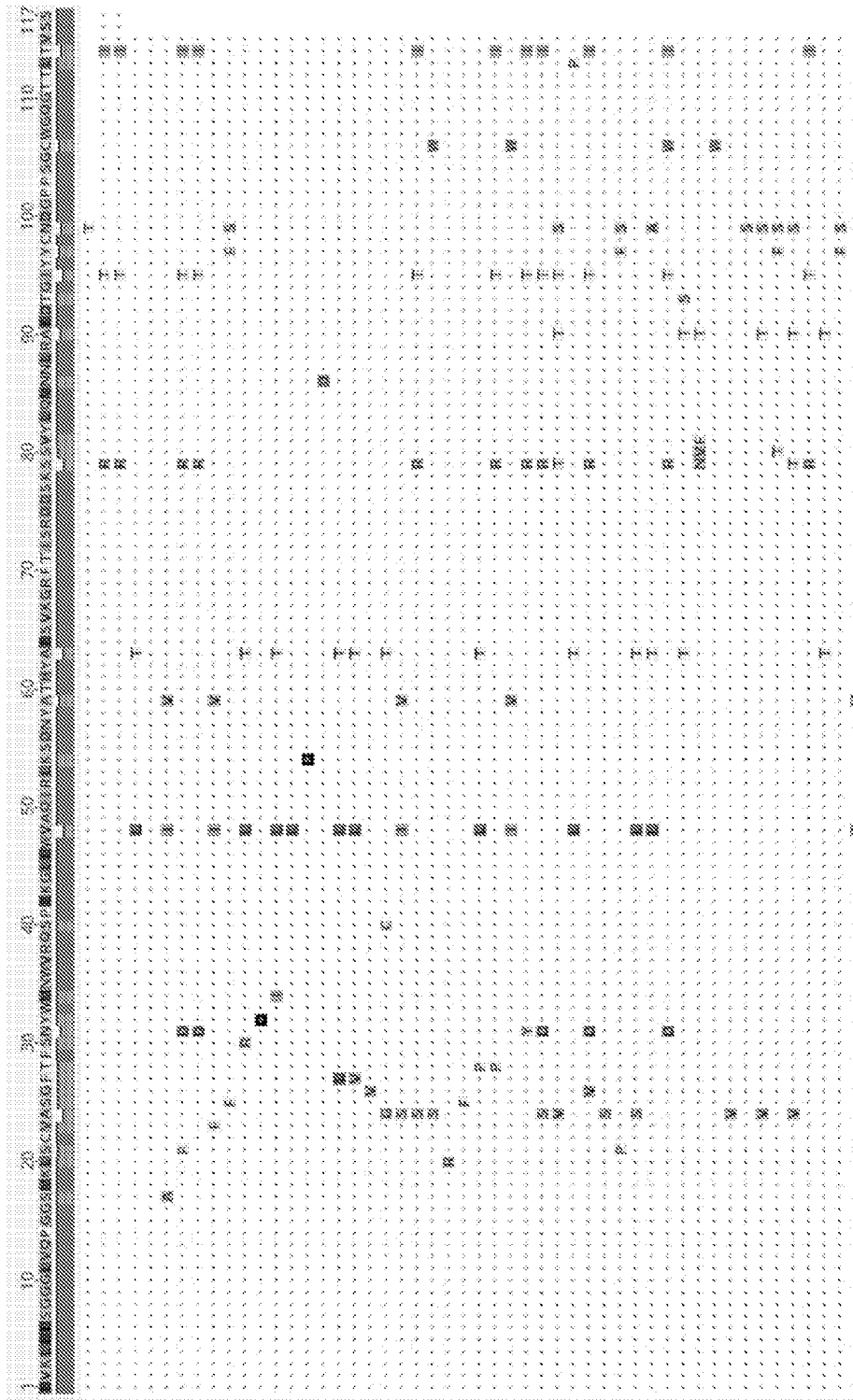


FIGURA 21

FIG. 22

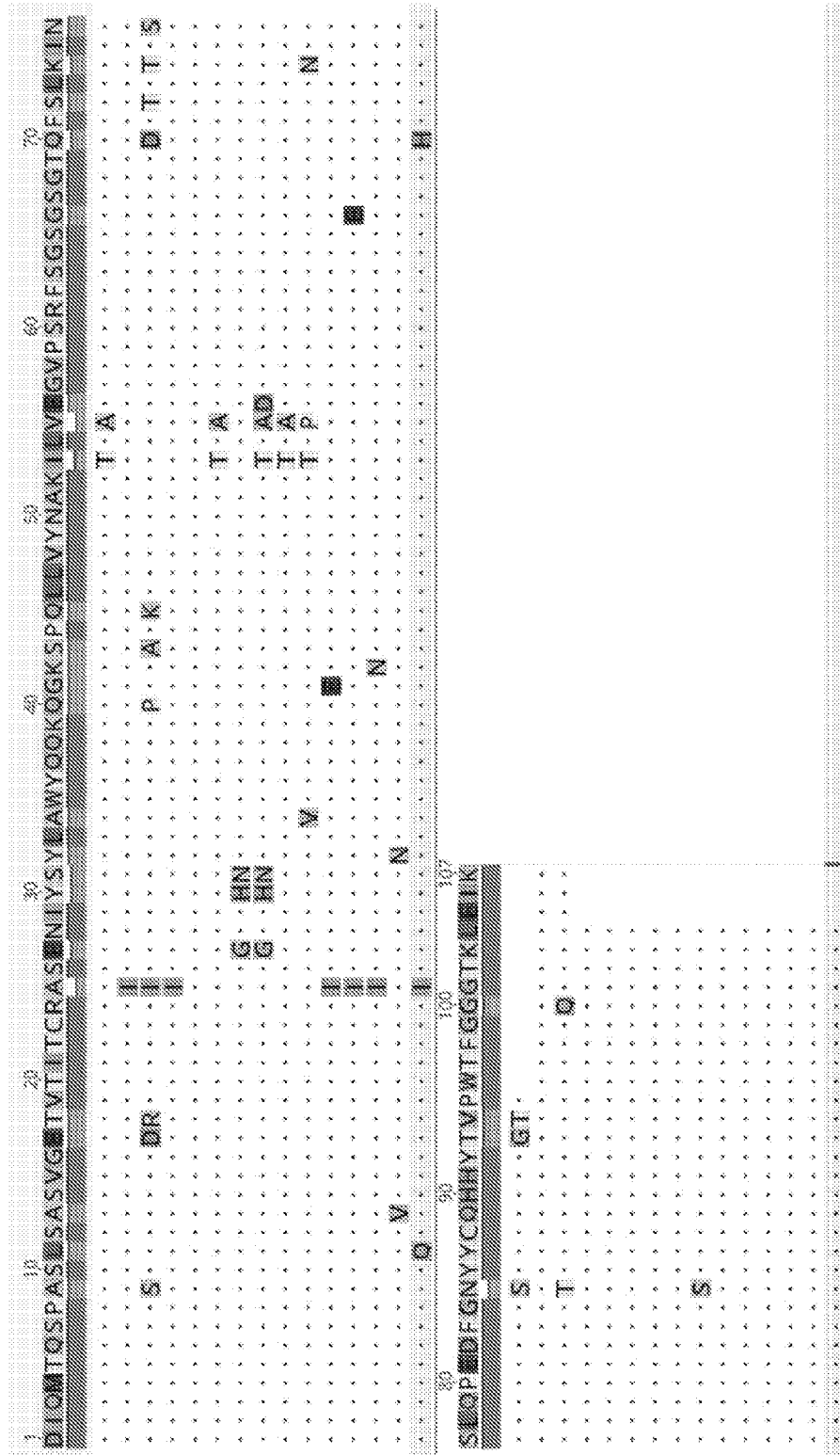
Región variable de cadena pesada (VH)	Región variable de cadena ligera (VL)	
hAB3	hAB3	
EVQLLESGDGVQPKSCDKGKPKVQLVQVGGQSLKSGTASV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNISYSLANYSQKRAFLVNNAKIL	
YADSVKQRTTIIRDUSKNTVLLQNSLRSEDTGYTCWCPSPGSGWQKILLTVSS	VEQVTPRFSQSSTGTHLIIISLQPEDPTTYCQHHITVTVTWVFGQTKLEIK	
S1	S1	
EVQLLESGDGVQPKSCDKGKPKVQLVQVGGQSLKSGTASV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNISYSLANYSQKRAFLVNNAKIL	
YADSVKQRTTIIRDUSKNTVLLQNSLRSEDTGYTCWCPSPGSGWQKILLTVSS	VEQVTPRFSQSSTGTHLIIISLQPEDPTTYCQHHITVTVTWVFGQTKLEIK	
S2	S2	
EVQLLESGDGVQPKSCDKGKPKVQLVQVGGQSLKSGTASV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNISYSLANYSQKRAFLVNNAKIL	
YADSVKQRTTIIRDUSKNTVLLQNSLRSEDTGYTCWCPSPGSGWQKILLTVSS	VEQVTPRFSQSSTGTHLIIISLQPEDPTTYCQHHITVTVTWVFGQTKLEIK	
S3	S3	
EVQLLESGDGVQPKSCDKGKPKVQLVQVGGQSLKSGTASV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNISYSLANYSQKRAFLVNNAKIL	
YADSVKQRTTIIRDUSKNTVLLQNSLRSEDTGYTCWCPSPGSGWQKILLTVSS	VEQVTPRFSQSSTGTHLIIISLQPEDPTTYCQHHITVTVTWVFGQTKLEIK	
S4	S4	
EVQLLESGDGVQPKSCDKGKPKVQLVQVGGQSLKSGTASV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNISYSLANYSQKRAFLVNNAKIL	
YADSVKQRTTIIRDUSKNTVLLQNSLRSEDTGYTCWCPSPGSGWQKILLTVSS	VEQVTPRFSQSSTGTHLIIISLQPEDPTTYCQHHITVTVTWVFGQTKLEIK	
S5	S5	
EVQLLESGDGVQPKSCDKGKPKVQLVQVGGQSLKSGTASV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNISYSLANYSQKRAFLVNNAKIL	
YADSVKQRTTIIRDUSKNTVLLQNSLRSEDTGYTCWCPSPGSGWQKILLTVSS	VEQVTPRFSQSSTGTHLIIISLQPEDPTTYCQHHITVTVTWVFGQTKLEIK	
S6	S6	
EVQLLESGDGVQPKSCDKGKPKVQLVQVGGQSLKSGTASV	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNISYSLANYSQKRAFLVNNAKIL	
YADSVKQRTTIIRDUSKNTVLLQNSLRSEDTGYTCWCPSPGSGWQKILLTVSS	VEQVTPRFSQSSTGTHLIIISLQPEDPTTYCQHHITVTVTWVFGQTKLEIK	
hAB1	hAB1	
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASQGTFTITTYTHHWKAPQGLLWVQV	DIQLQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNISYSLANYSQKRAFLVNNAKIL	
QKQKQRTTLADKSTSTVMEISLASEDTAVYTCANQDYYVAYWQKILLTVSS	VEQVTPRFSQSSTGTHLIIISLQPEDPTTYCQHHITVTVTWVFGQTKLEIK	
S7	S7	
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASQGTFTITTYTHHWKAPQGLLWVQV	DIQLQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNISYSLANYSQKRAFLVNNAKIL	
QKQKQRTTLADKSTSTVMEISLASEDTAVYTCANQDYYVAYWQKILLTVSS	VEQVTPRFSQSSTGTHLIIISLQPEDPTTYCQHHITVTVTWVFGQTKLEIK	
S8	S8	
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASQGTFTITTYTHHWKAPQGLLWVQV	DIQLQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNISYSLANYSQKRAFLVNNAKIL	
QKQKQRTTLADKSTSTVMEISLASEDTAVYTCANQDYYVAYWQKILLTVSS	VEQVTPRFSQSSTGTHLIIISLQPEDPTTYCQHHITVTVTWVFGQTKLEIK	
S9	S9	
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASQGTFTITTYTHHWKAPQGLLWVQV	DIQLQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNISYSLANYSQKRAFLVNNAKIL	
QKQKQRTTLADKSTSTVMEISLASEDTAVYTCANQDYYVAYWQKILLTVSS	VEQVTPRFSQSSTGTHLIIISLQPEDPTTYCQHHITVTVTWVFGQTKLEIK	
S10	S10	
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASQGTFTITTYTHHWKAPQGLLWVQV	DIQLQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNISYSLANYSQKRAFLVNNAKIL	
QKQKQRTTLADKSTSTVMEISLASEDTAVYTCANQDYYVAYWQKILLTVSS	VEQVTPRFSQSSTGTHLIIISLQPEDPTTYCQHHITVTVTWVFGQTKLEIK	
S11	S11	
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASQGTFTITTYTHHWKAPQGLLWVQV	DIQLQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNISYSLANYSQKRAFLVNNAKIL	
QKQKQRTTLADKSTSTVMEISLASEDTAVYTCANQDYYVAYWQKILLTVSS	VEQVTPRFSQSSTGTHLIIISLQPEDPTTYCQHHITVTVTWVFGQTKLEIK	
S12	S12	
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASQGTFTITTYTHHWKAPQGLLWVQV	DIQLQSPSSLSASVGDRVTITCRISDNISYSLANYSQKRAFLVNNAKIL	
QKQKQRTTLADKSTSTVMEISLASEDTAVYTCANQDYYVAYWQKILLTVSS	VEQVTPRFSQSSTGTHLIIISLQPEDPTTYCQHHITVTVTWVFGQTKLEIK	

FIG. 23



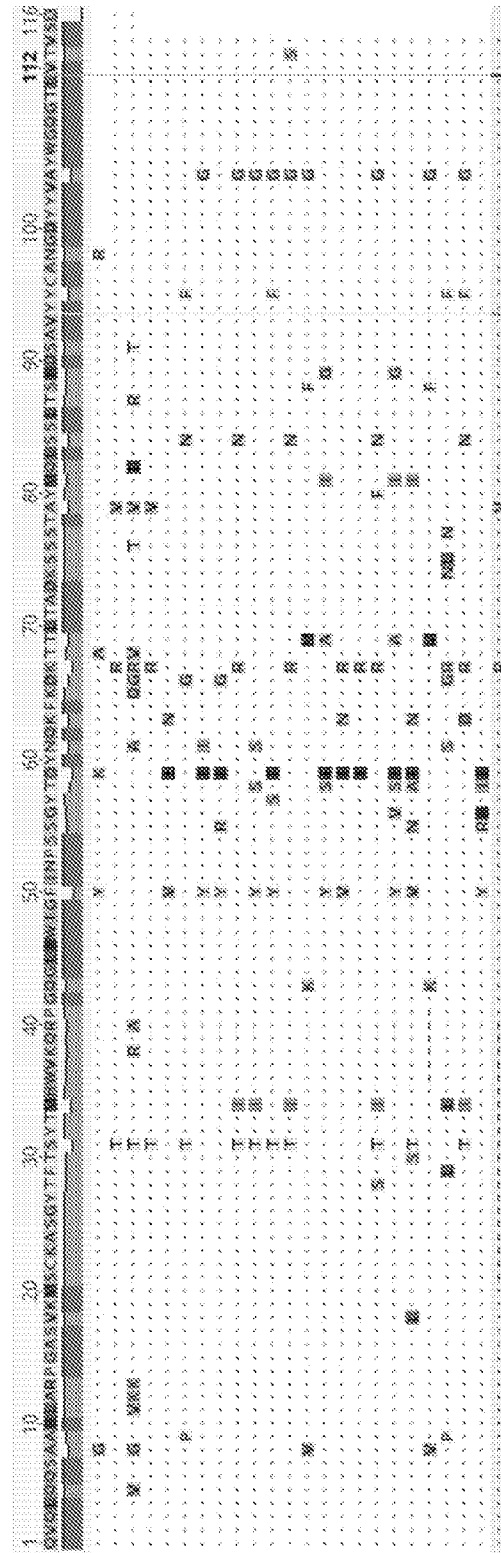
Cadena pesada de AB3: A(H24)SV, G(H26)V, N(H31)D, V(H48)IL, A(H56)V, A(H60)T, S(N76)RK, A(H84)T, I(H89)T, Y(H91)F, A(H93)S, C(H102)W

FIG. 24



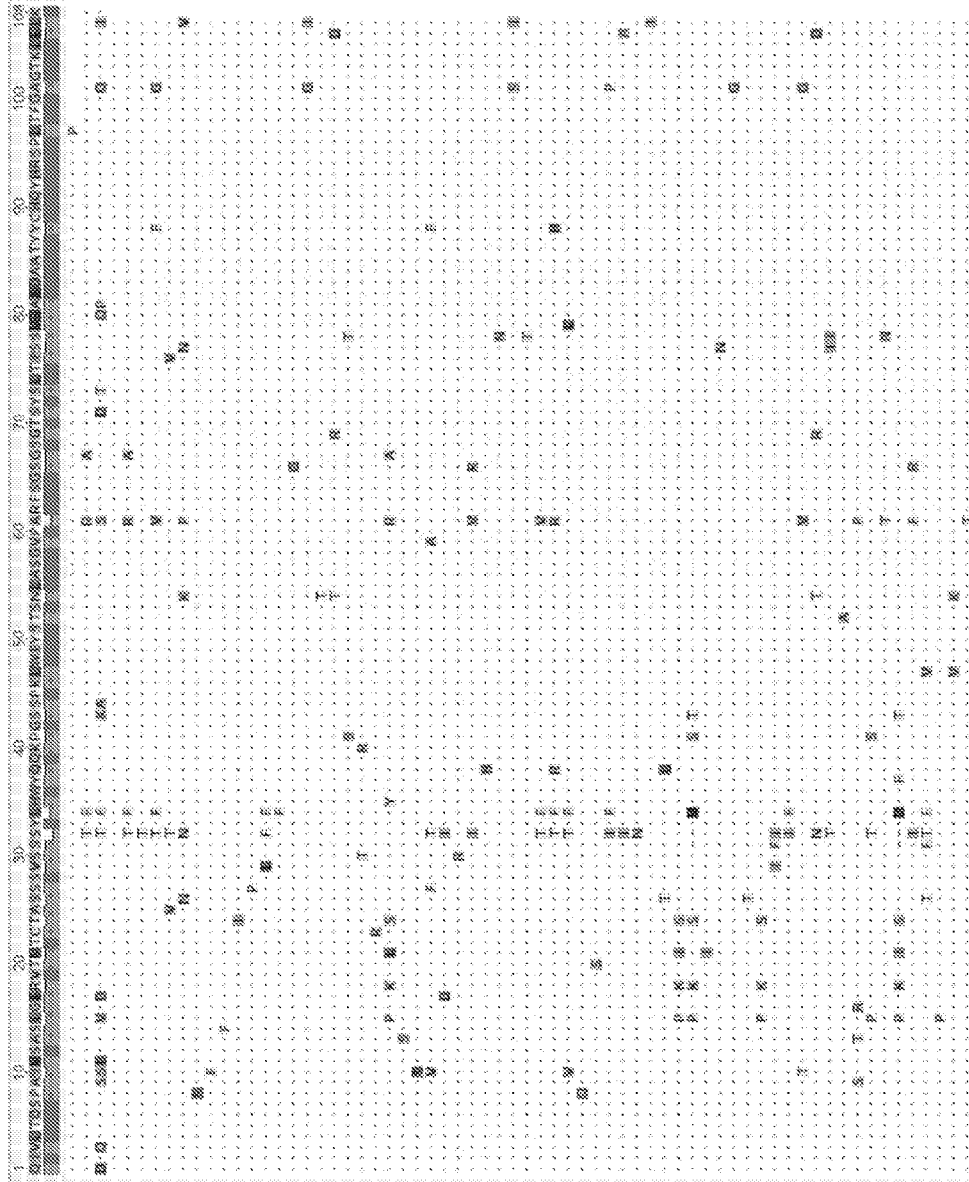
Cadena ligera de AB3: A(L25)IVL, T(L53)I, V(L55)A, S(L85)TNR,

FIG. 25



Cadena pesada de AB1: S(H31)T, M(H34)IL, Y(H50)FV, T(H57)S, D(H58)E, K(H62)N, D(H72)G, K(H73)R,
A(H78)V, S(H82a)N, Y(H98)F, A(H101)G

FIG. 26



Cadena ligera de AB1: S(L31)TIN, L(L33)FM, A(H60)RVPT, N(H53)TK

FIG. 27

	D	E	F	G	H	I	J	K	L	N	O	P	Q
	concentración (mg/ml)	inhibidor PAGE (%)	concentración ajustada (mg/ml)	4.8ug anticuerpo la 765 to make id	HK2031 765 to make 4.5ul	HK2031 potencial 1.0ug	HK2031 CLDN6 Chon A11 1.0ug	M202 1.0ug	AB2-1.0ug potencial 1.0ug G19	CLDN6 Chon A11.1.0ug G19	M202 1.0ug G19	AB2-1.0ug potencial 1.0ug G19	AB2-1.0ug potencial 1.0ug G19
1													
2	4.04	95	3.84	1.17	43.83	790.77	151.670.15	1,577.77	26,871.38	1,987.72	255,609.72	3,129.07	2,547.29
3	4.86	95	4.62	0.97	44.03	775.16	162.035.52	1,031.60	38,481.74	2,000.32	255,311.20	3,132.12	3,089.45
4	4.19	90	3.77	1.19	43.81	1,012.63	179,393.08	1,766.40	40,340.11	2,035.44	268,949.57	3,125.73	3,364.88
5	4.04	90	3.64	1.24	43.76	871.63	101,300.51	1,176.11	13,041.68	2,099.52	256,342.66	3,199.44	3,037.91
6	4.6	90	4.14	1.09	43.91	1,182.99	172,763.22	1,619.41	45,508.76	2,247.94	218,014.63	3,097.02	3,138.87
7	3.87	90	3.48	1.29	43.71	1,776.60	137,752.47	1,911.32	30,006.33	2,313.18	247,752.35	3,077.88	2,883.57
8	10	100	10.00	0.45	44.55	588.33	107,697.75	711.13	11,164.56	2,342.33	231,765.77	3,195.62	3,260.58
9	7.57	95	7.19	0.63	44.37	760.56	146,464.50	859.31	30,749.09	2,641.52	444,449.47	2,500.27	3,185.14
10	9.03	95	8.58	0.52	44.48	1,032.63	142,194.71	4,291.82	157,421.48	2,865.74	454,895.34	4,413.56	2,906.09
11	3.56	95	3.38	1.33	43.67	996.33	148,768.61	1,359.04	139,707.98	2,806.37	469,990.24	2,415.04	3,467.41
12	9.27	90	8.34	0.54	44.46	731.67	148,025.10	1,172.48	81,039.93	2,882.36	466,422.96	2,450.33	2,885.77
13	3.82	95	3.63	1.24	43.76	738.75	147,975.03	813.74	109,817.51	2,637.38	459,343.61	2,514.71	2,895.76
14	1.58	95	1.50	3.00	42.00	979.19	157,476.89	1,208.61	110,696.17	2,814.89	448,763.33	2,551.39	3,612.99
15	10	100	10.00	0.45	44.55	1,049.34	138,381.25	4,056.15	61,308.34	2,877.20	443,566.10	4,653.58	2,849.07

Fila 1: AB-S1

Fila 2: AB-S2

Fila 3: AB-S3

Fila 4: AB-S4

Fila 5: AB-S5

Fila 6: AB-S6

Fila 8: AB3-7 humanizado

Fila 9: AB-S7

Fila 10: AB-S8

Fila 11: AB-S9

Fila 12: AB-S10

Fila 13: AB-S11

Fila 14: AB-S12

Fila 15: AB1-11 humanizado

Columna L: línea celular que
sobreeexpresa artificialmente CLDN6
Columna K: línea celular sin expresión
de CLDN6
Columna L: línea celular con alta
expresión endógena de CLDN6

FIG. 28

OV90		AB3-7	AB-S1	AB-S2	AB-S3	AB-S4	AB-S5	AB-S6	AB1-11	AB-S7	AB-S8	AB-S9	AB-S10	AB-S11	AB-S12
nM															
1000	9.305.47	100.506.36	107.583.14	117.619.48	41.952.41	13.673.44	76.606.87	53.936.25	71.082.35	53.936.25	117.619.48	117.619.48	135.184.17	117.578.36	93.369.67
200	2.333.88	63.483.58	63.965.01	63.078.33	15.902.43	73.344.53	38.556.51	32.455.99	24.011.58	32.455.99	38.556.51	38.556.51	37.858.12	85.556.87	38.509.73
40	1.140.44	10.526.93	18.070.76	19.511.47	4.394.96	22.485.01	12.605.56	7.824.04	9.568.14	9.568.14	12.605.56	12.605.56	50.429.98	44.913.69	14.607.93
8	565.19	2.354.72	3.954.99	4.470.79	1.359.65	5.219.16	2.954.23	2.446.37	4.456.10	4.456.10	5.219.16	5.219.16	16.284.65	14.736.67	4.651.10
1.6	566.97	667.93	1.044.49	1.044.49	514.97	1.041.22	750.82	782.7	2.912.08	2.912.08	514.97	514.97	4.865.96	4.949.96	1.662.03
0.32	393.29	474.6	536.69	482.04	431.92	557.96	466.55	451.73	586.44	586.44	466.55	466.55	861.52	1.456.35	637.98

APK2		AB3-7	AB-S1	AB-S2	AB-S3	AB-S4	AB-S5	AB-S6	AB1-11	AB-S7	AB-S8	AB-S9	AB-S10	AB-S11	AB-S12
nM															
1000	11.462.72	130.796.91	133.530.45	126.712.81	67.454.84	140.708.57	104.778.29	50.496.58	76.677.97	76.677.97	104.778.29	104.778.29	155.688.22	145.924.66	119.570.71
200	3.056.92	61.420.67	61.339.04	63.601.27	31.648.82	79.615.38	54.104.45	15.448.77	46.895.00	46.895.00	79.615.38	79.615.38	124.517.42	107.583.14	92.341.09
40	1.636.26	25.767.00	21.019.91	24.569.08	6.351.34	25.677.71	14.613.41	3.462.10	15.969.78	15.969.78	24.569.08	24.569.08	66.115.49	59.411.70	22.640.15
8	991.01	3.849.71	4.842.46	4.828.11	1.717.35	5.558.19	3.600.86	2.286.95	6.294.39	6.294.39	4.842.46	4.842.46	27.535.45	20.102.93	8.853.51
1.6	588.72	1.363.77	951.93	932.17	438.42	996.98	765.41	616.75	2.354.92	2.354.92	932.17	932.17	7.686.93	6.095.07	1.681.83
0.32	402.37	466.3	608.48	571.86	354.47	972.11	447.5	377.07	876.2	876.2	447.5	447.5	2.082.26	2.134.09	1.313.75

UNNUCA		AB3-7	AB-S1	AB-S2	AB-S3	AB-S4	AB-S5	AB-S6	AB1-11	AB-S7	AB-S8	AB-S9	AB-S10	AB-S11	AB-S12
nM															
1000	9.837.80	41.530.55	46.706.72	45.256.69	35.013.60	47.348.78	42.350.16	22.779.99	37.313.06	37.313.06	47.348.78	47.348.78	35.084.88	35.386.97	46.577.83
200	2.111.03	18.894.04	20.045.12	20.752.72	13.455.55	19.044.43	12.538.34	25.700.59	16.749.15	16.749.15	19.044.43	19.044.43	22.252.77	19.899.43	37.830.88
40	1.115.88	6.676.95	6.965.68	7.782.50	4.121.95	7.079.11	4.120.12	4.153.48	7.974.52	7.974.52	6.965.68	6.965.68	9.401.51	12.811.06	14.751.95
8	724.24	2.233.28	2.156.97	1.983.06	1.298.77	2.342.93	3.300.30	1.605.67	3.839.36	3.839.36	2.156.97	2.156.97	6.651.23	6.596.29	5.635.45
1.6	566.89	765.79	745.15	646.96	551.25	884.81	1.683.97	839.48	1.791.21	1.791.21	646.96	646.96	2.538.59	2.765.67	1.913.10
0.32	504.17	639.23	506.04	532.85	512.11	491.4	1.313.59	617.87	2.441.28	2.441.28	506.04	506.04	873.75	2.348.83	947.24

FIG. 29A

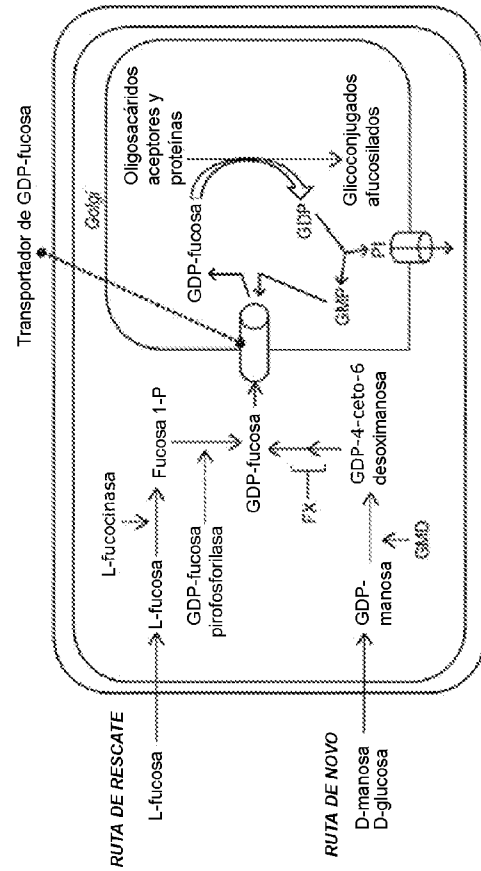
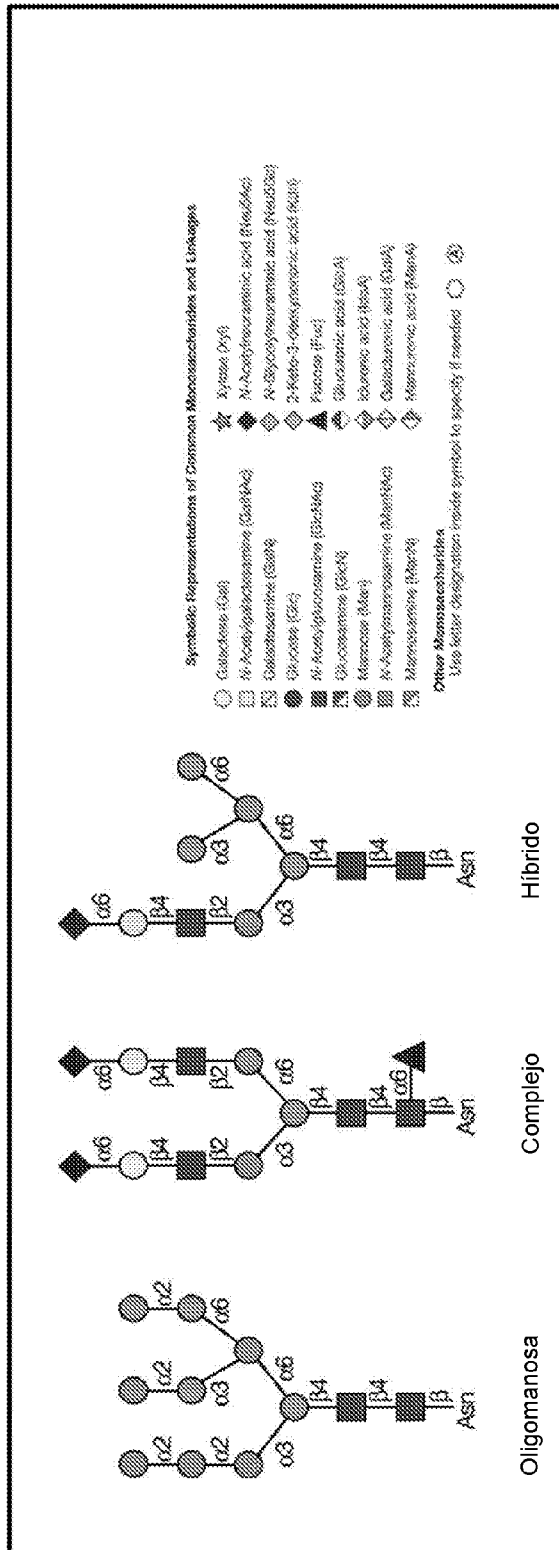


FIG. 29B

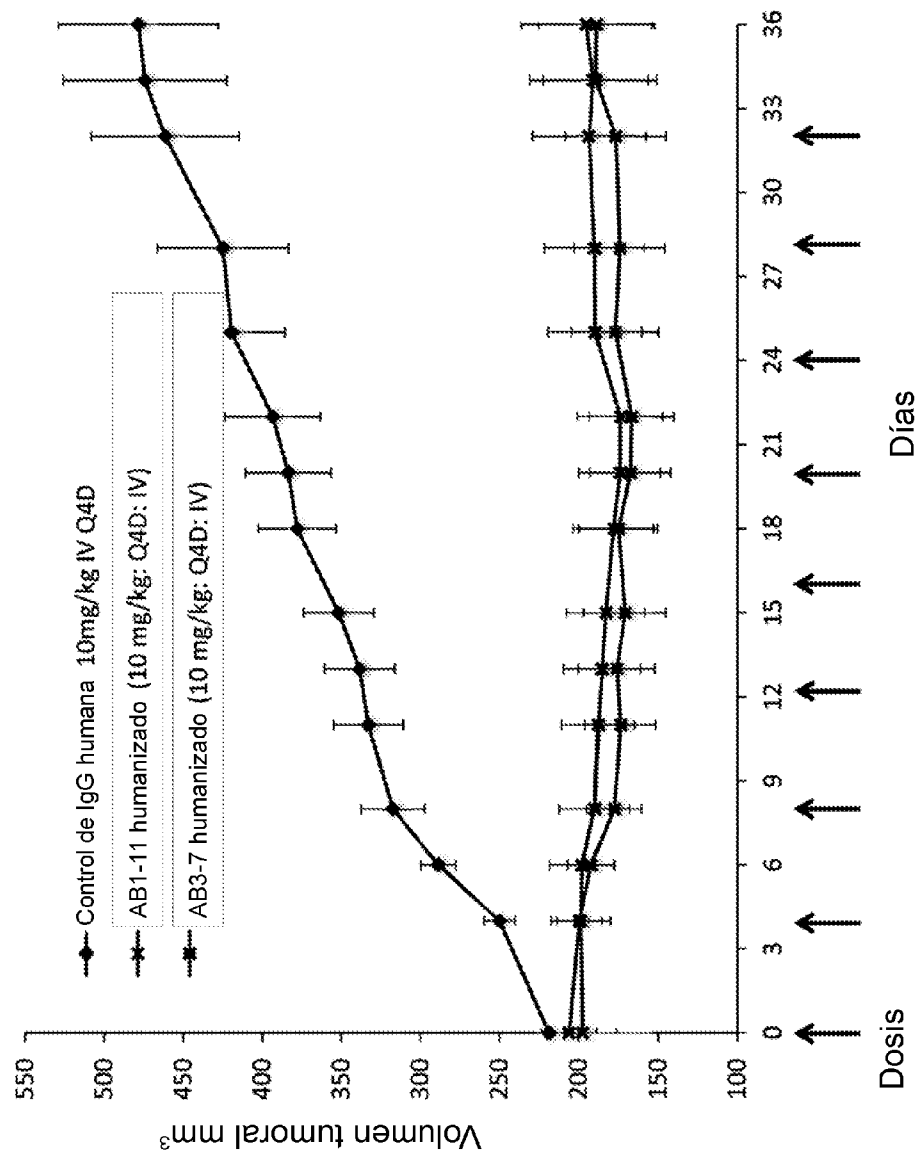
FIG. 30

FIG. 31

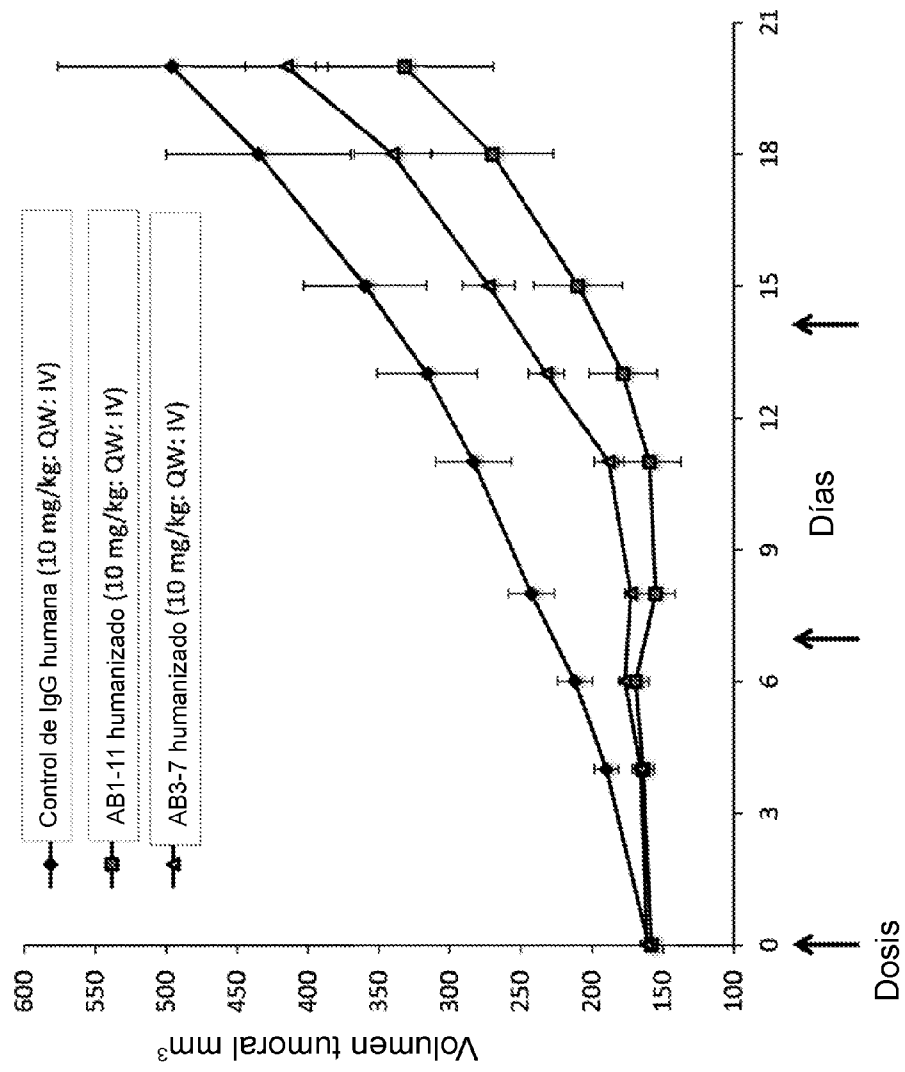
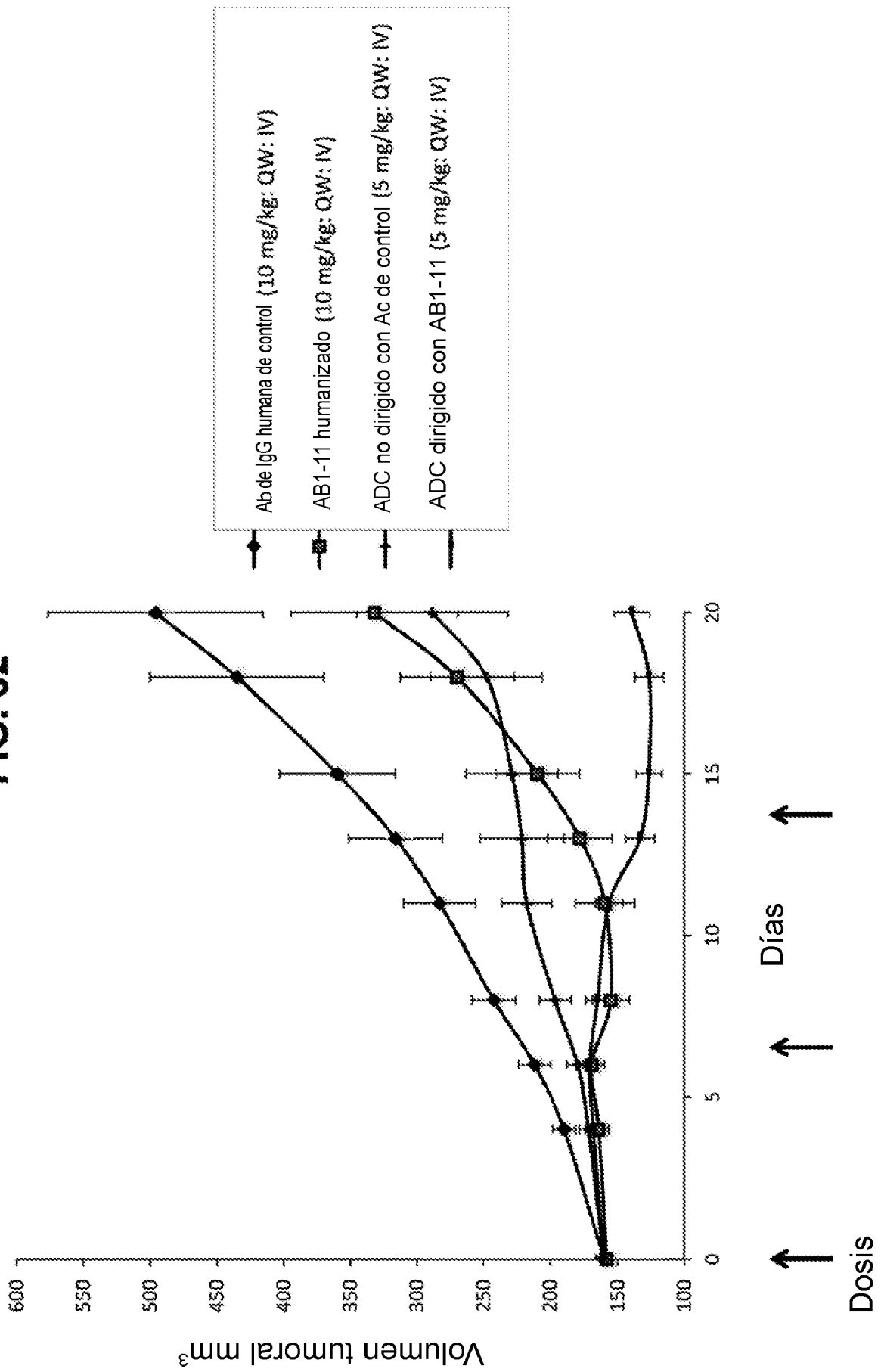


FIG. 32



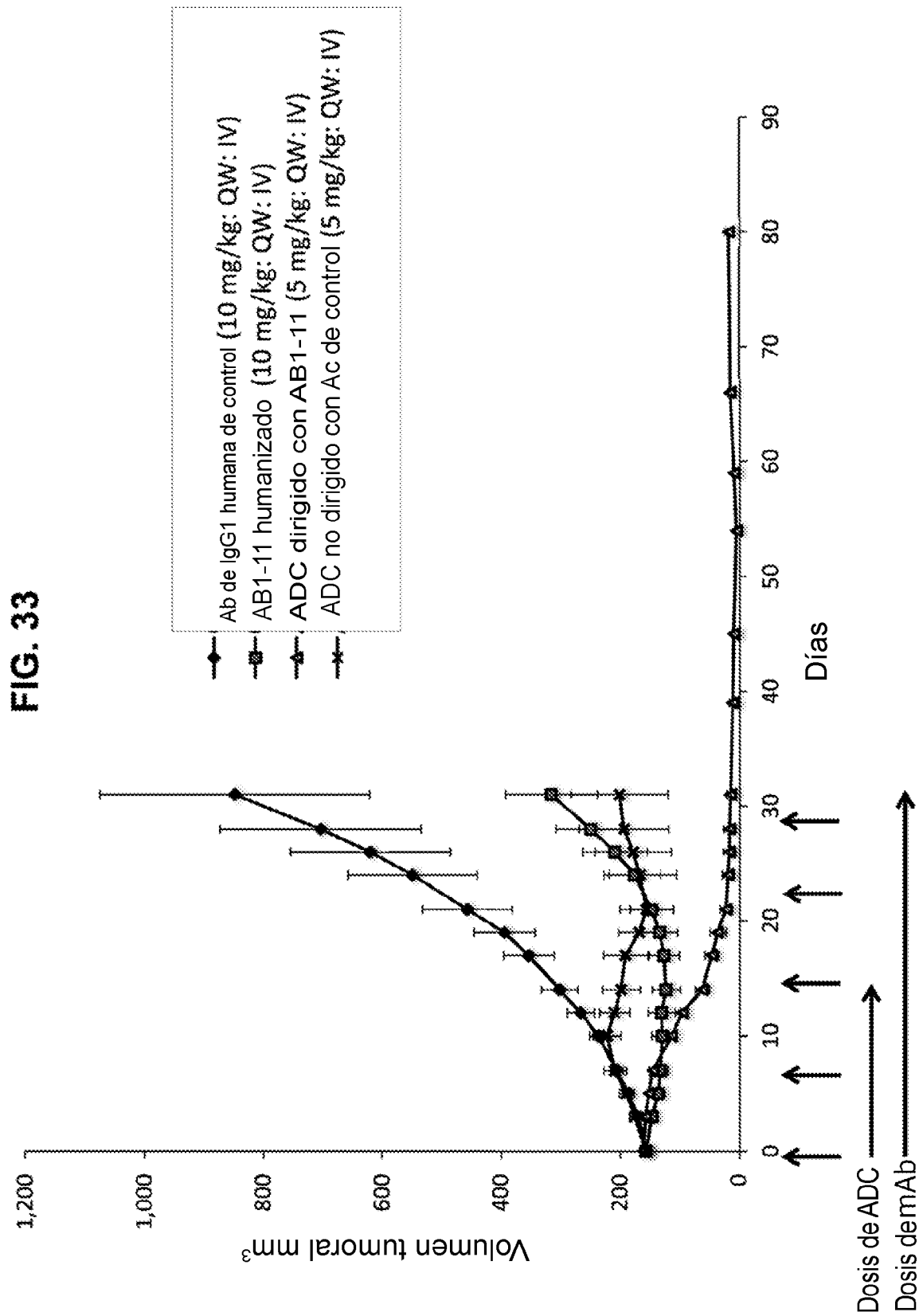


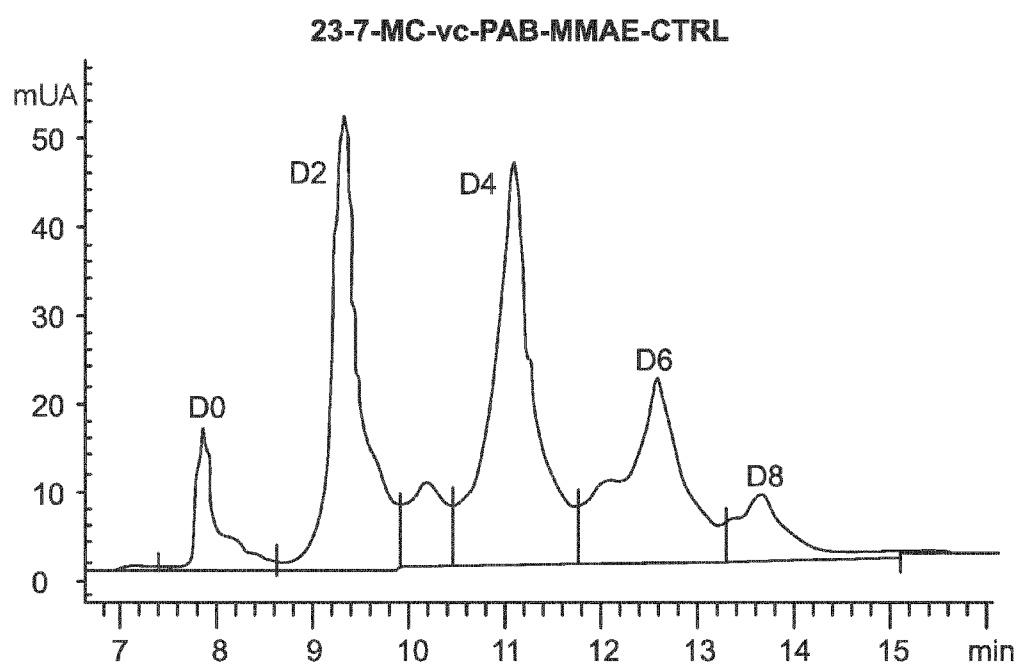
Tabla de resumen

FIG. 34A

N.º de lote	HIC-DAR	SEC-DAR	D4 (%)	No conjugado (%)	Conc. (mg/ml)	Pureza HMWS (%)	Fármaco libre (%)	Endotoxina (UE/mg)	Rendimiento (mg)
WBP2227-20191219-23-7-MC-vc-PAB-MMAE-CTRL	3.92	-	33.0	6.0	5.21	97.8	1.1	0.1	65
WBP2227-20200102-23-7-MC-vc-PAB-MMAE-D4	4.06	-	74.9	2.4	4.15	96.8	<0.2	0.2	64
WBP2227-20200109-23-7-MC-GGFG-MMAE-D4	3.91	-	71.6	3.0	3.90	98.2	0.4 ^c	0.4 ^d	55
WBP2227-20191231-23-7-CL2A-SN38-CTRL ^a	-	4.02	-	13.0	2.85	96.7	<1 ^c	0.1 ^d	52
WBP2227-20200113-23-7-CL2A-SN38-D4 ^a	-	4.26	73.1	6.0	4.37	97.1	<1 ^c	0.1 ^d	62
WBP2227-2020010723-7-MC-GGFG-Dxd	3.90	-	64.1	6.2	3.22	97.1	0.4	0.1 ^d	65
WBP2227-20200113-23-7-MC-vc-PABDxd ^b	3.90	-	61.4	10.3	4.25	97.9	1.87	0.2	66

- Tampón de almacenamiento y temperatura: L-histidina 20 mM, pH 5.5; -80°C
- DAR y mAb no conjugado determinado mediante HIC-HPLC
- Concentración determinada mediante Nanodrop One
- Pureza y agregación determinadas mediante SEC-HPLC
- Fármaco libre determinado mediante RP-HPLC con columna C18
- Nivel de endotoxinas determinado mediante endosafe-PTS 9547
- a. Tampón de almacenamiento y temperatura: ácido succínico 20 mM, pH 6.0; -80°C
- b. Tampón de almacenamiento y temperatura: L-histidina 20 mM, pH 6.0; -80°C
- c. Fármaco libre determinado mediante RP-HPLC-espectro de masas con columna C4
- d. Nivel de endotoxinas determinado mediante pruebas de turbidimétricas cinéticas de Limulus

FIG. 34B



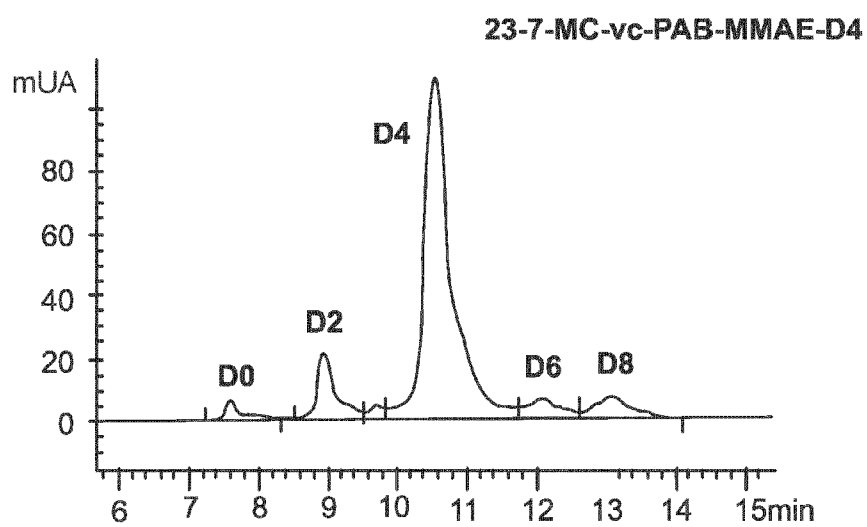


FIG. 34C

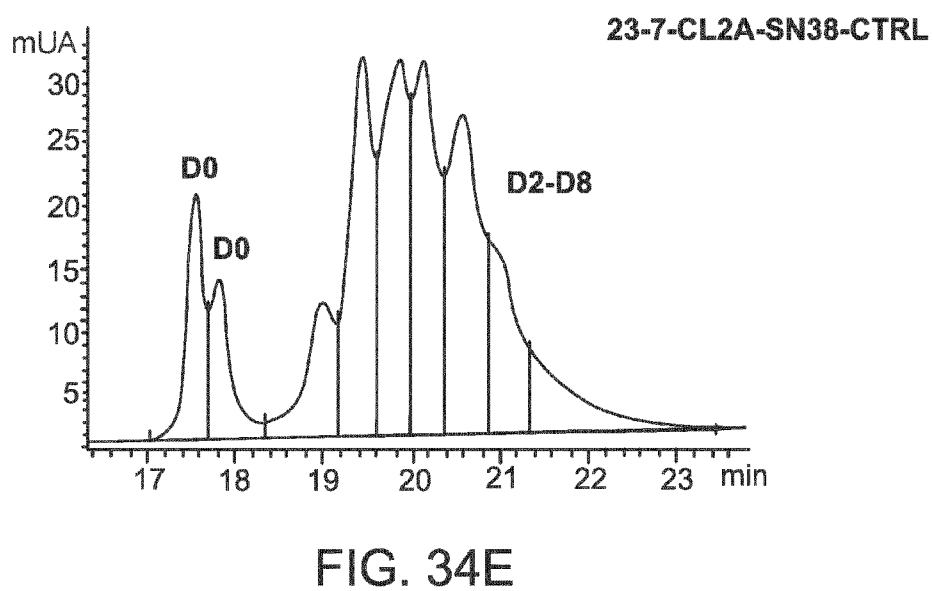
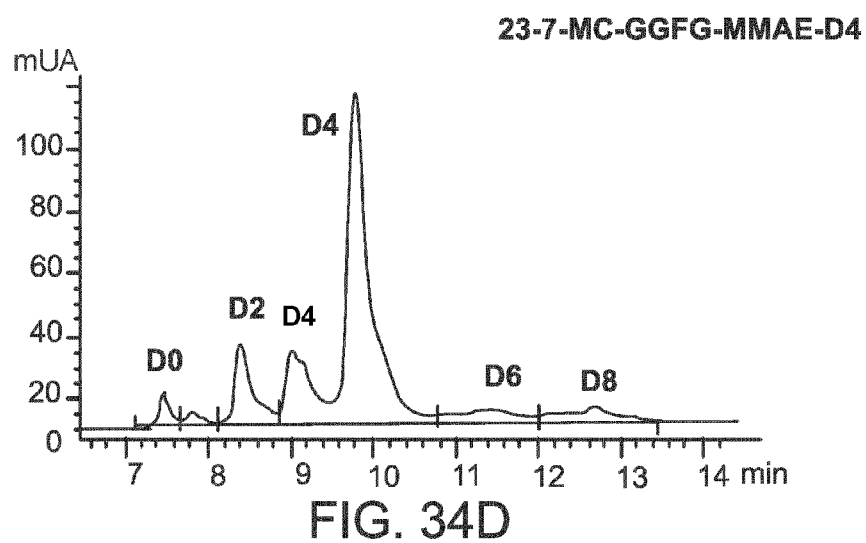


FIG. 34F

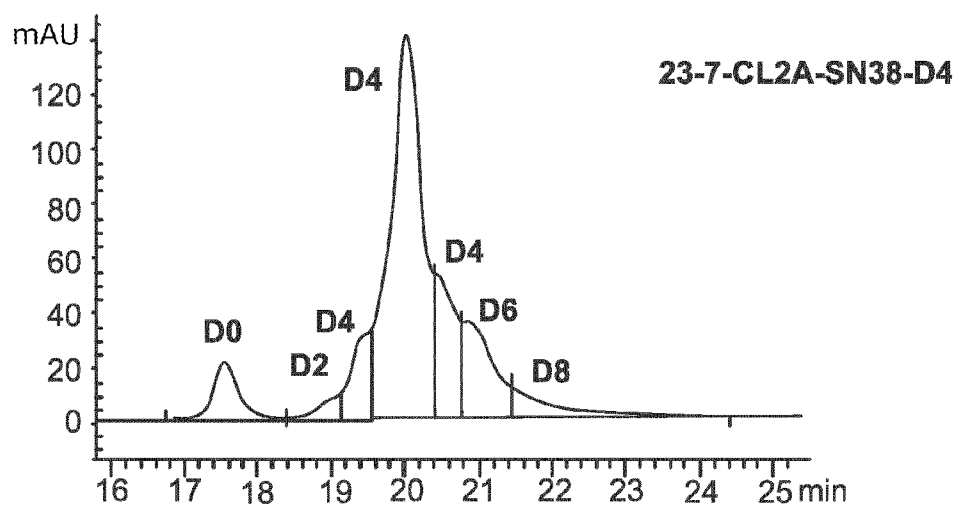


FIG. 34G

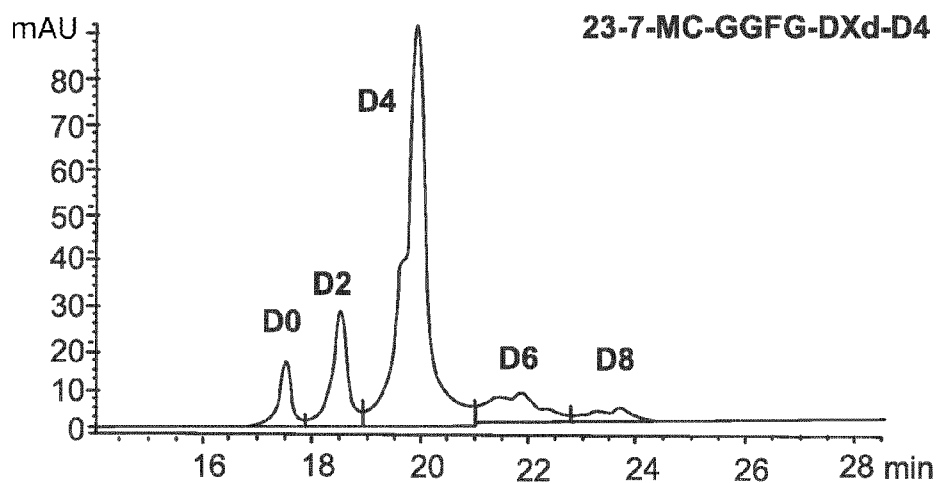
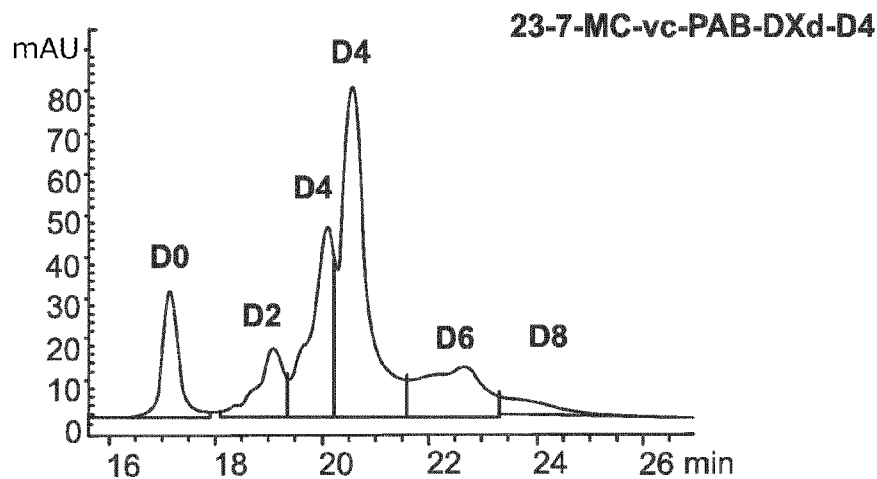


FIG. 34H



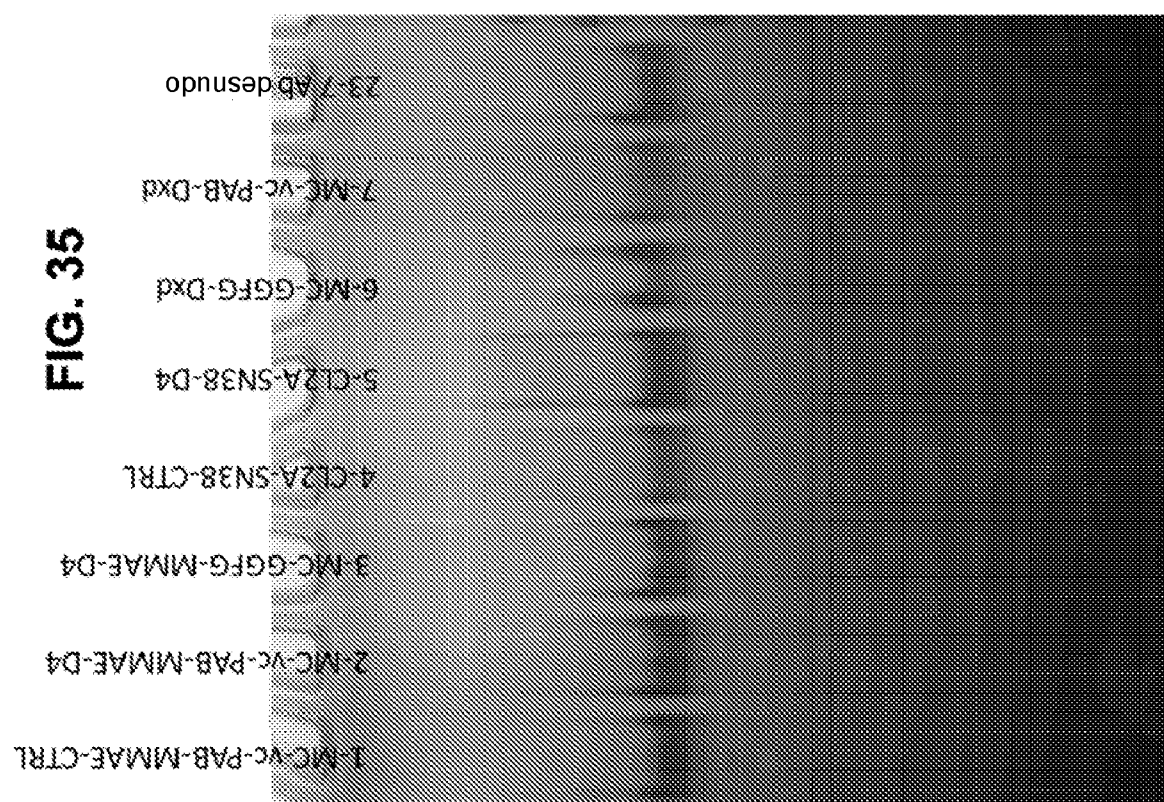


FIG. 36

	CLDN6-ADCs	Etiqueta en flujo	0.1 µg de Ab/muestra				1 µg de Ab/muestra			
			Linea celular positiva	Linea celular de OE artificial positiva	Linea celular negativa	Linea celular positiva	Linea celular de OE artificial positiva	Linea celular negativa	Linea celular positiva	Linea celular negativa
			UMUC4	HEK293T CLDN6-mGFP A11	M202	UMUC4	HEK293T CLDN6-mGFP A11	M202		
1	WBP2227-20191219-23-7-MC-vc-PAB-MMAE-CTRL	23-7-ADC1	8,919.55	128,083.32	927.12	28,820.18	204,123.83	862.54		
2	WBP2227-20200102-23-7-MC-vc-PAB-MMAE-D4	23-7-ADC2	9,446.99	126,605.73	893.31	26,899.61	242,085.63	913.31		
3	WBP2227-20200109-23-7-MC-GGFG-MMAE-D4	23-7-ADC3	8,789.80	135,083.24	769.02	31,565.36	274,145.07	726.01		
4	WBP2227-20191231-23-7-CL2A-SN38-CTRL	23-7-ADC4	9,986.85	125,873.13	730.25	33,821.28	257,200.13	914.24		
5	WBP2227-20200113-23-7-CL2A-SN38-D4	23-7-ADC5	9,138.96	134,515.99	831.15	34,593.90	312,740.03	796.68		
6	WBP2227-20200107-23-7-MC-GGFG-Dxd	23-7-ADC6	10,489.23	120,680.42	854.62	32,801.25	196,185.70	823.43		
7	WBP2227-20200113-23-7-MC-vc-PAB-Dxd	23-7-ADC7	10,793.44	110,404.22	741.90	32,637.45	194,003.99	939.83		
8	CLDN6 #23-7 Ac desnudo (el mismo lote)	23-7	8,823.06	107,267.03	744.69	27,278.44	232,045.32	833.69		
9	Solo 2º Ac	Solo 2º Ac	1,114.73	1,242.89	778.98	1,114.73	1,242.89	778.98		

FIG. 37

CLDN6 ADCs	KD			Nivel de expresión		Curvas de equilibrio	Modelo celular	Células desprendidas mediante
	KD (nM)	% de error	Intervalo de confianza del 95% (IC)	Nivel de expresión	Intervalo de confianza del 95% (IC)			
WBP2227-20191219-23-7-MC-vc-PAB-MMAE-CTRL	6.68	3.59	3.41nM - 14.99nM	9.843E+05	5.714E+05 - 2.220E+06	500pM, 10nM	HEK293T CLDN6-mGFP A11	
WBP2227-20200102-23-7-MC-vc-PAB-MMAE-D4	5.34	4.89	1.49nM - 17.05nM	4.324E+05	1.112E+05 - 1.447E+06	500pM, 10nM		
WBP2227-20200109-23-7-MC-GGFG-MMAE-D4	1.01	2.84	0.56nM - 1.66nM	6.769E+05	5.015E+05 - 9.045E+05	500pM, 10nM		
WBP2227-20191231-23-7-CL2A-SN38-CTRL	1.91	3.45	1.05nM - 3.38nM	9.892E+05	7.024E+05 - 1.456E+06	500pM, 10nM		
WBP2227-20200113-23-7-CL2A-SN38-D4	2.87	4.65	1.07nM - 7.74nM	9.535E+05	4.935E+05 - 2.206E+06	500pM, 10nM		
WBP2227-20200107-23-7-MC-GGFG-Dxd	3.01	3.05	1.46nM - 6.47nM	9.922E+05	6.106E+05 - 1.822E+06	500pM, 10nM		
WBP2227-20200113-23-7-MC-vc-PAB-Dxd	3.42	2.52	2.10nM - 5.42nM	5.176E+05	3.440E+05 - 7.643E+05	500pM, 10nM		
CLDN6 Ab #23-7 (Ac desnudo)	1.13	2.57	0.53nM - 2.03nM	4.821E+05	3.155E+05 - 6.993E+05	500pM, 10nM		

FIG. 38

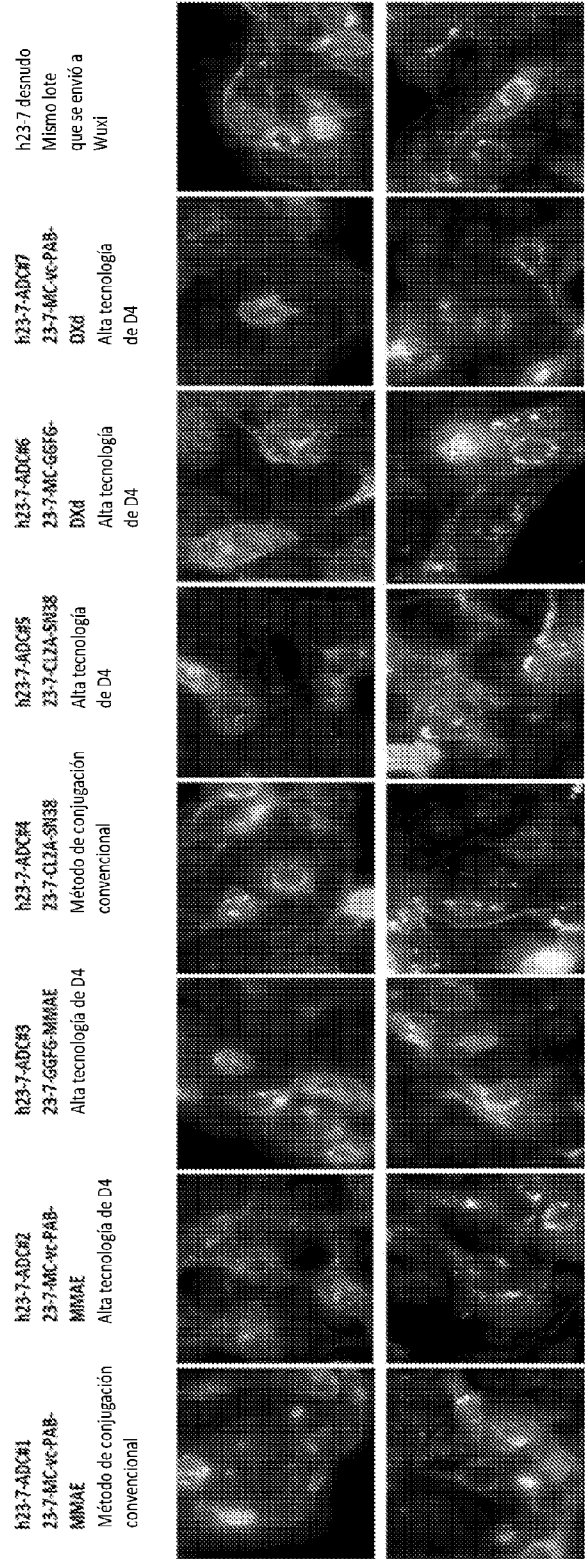


FIG. 39A

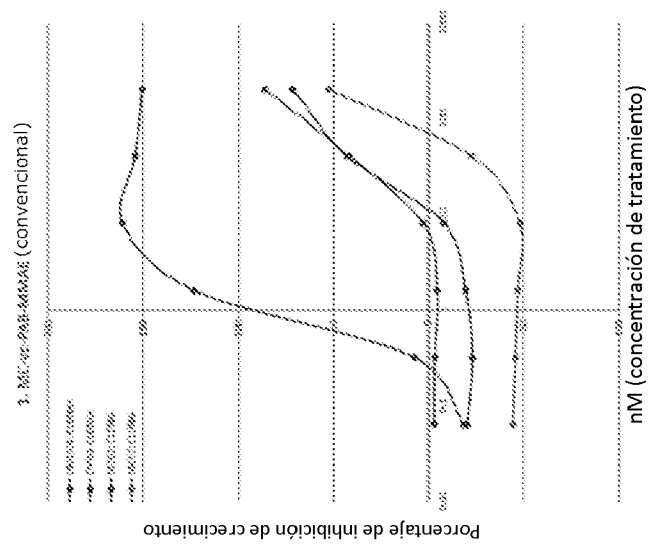


FIG. 39B

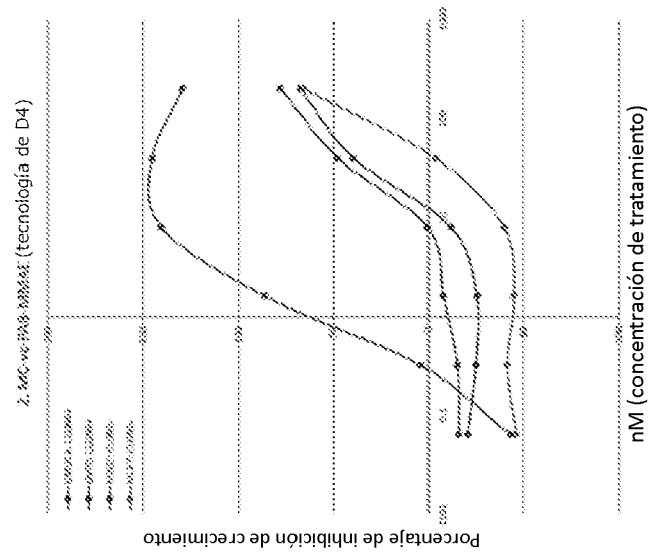


FIG. 39C

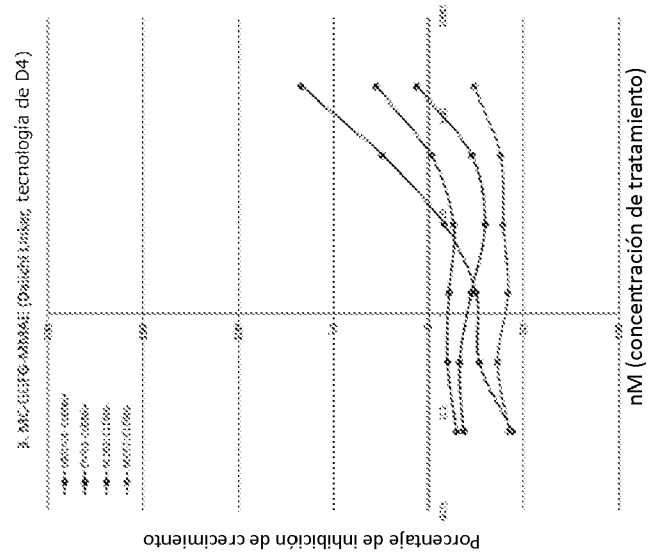


FIG. 39D

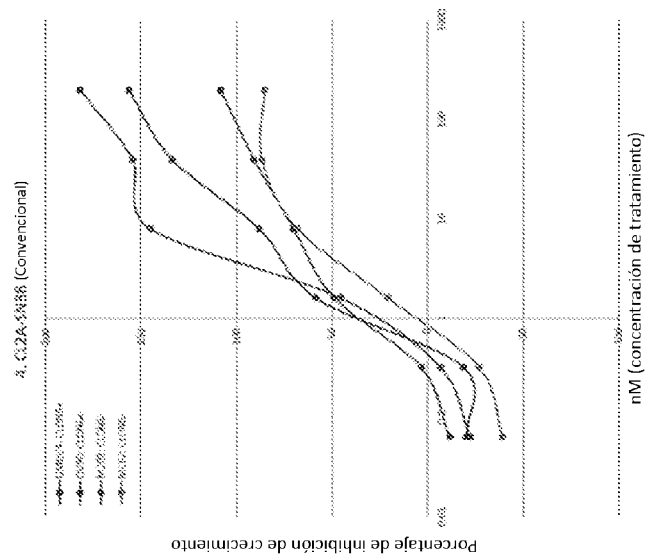


FIG. 39E

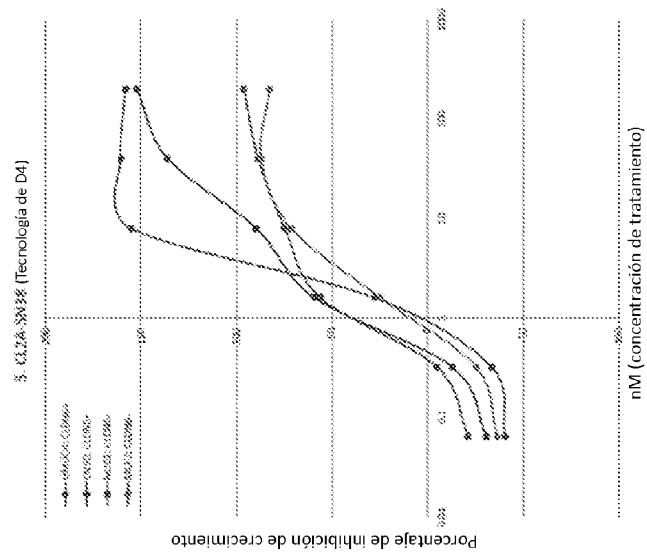


FIG. 39F

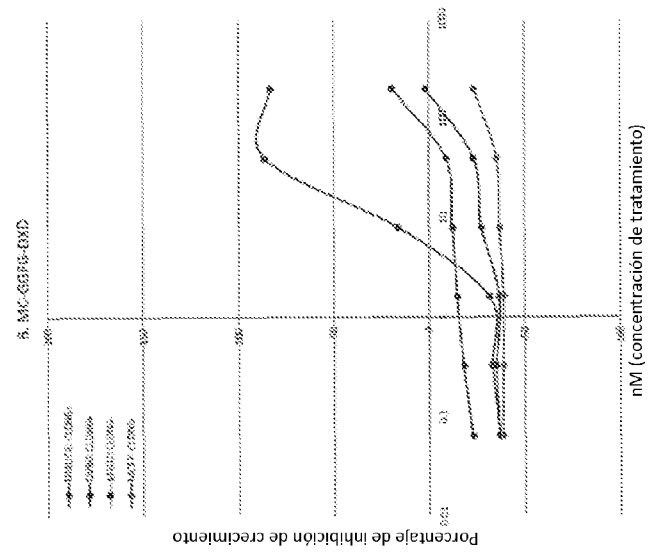


FIG. 39G

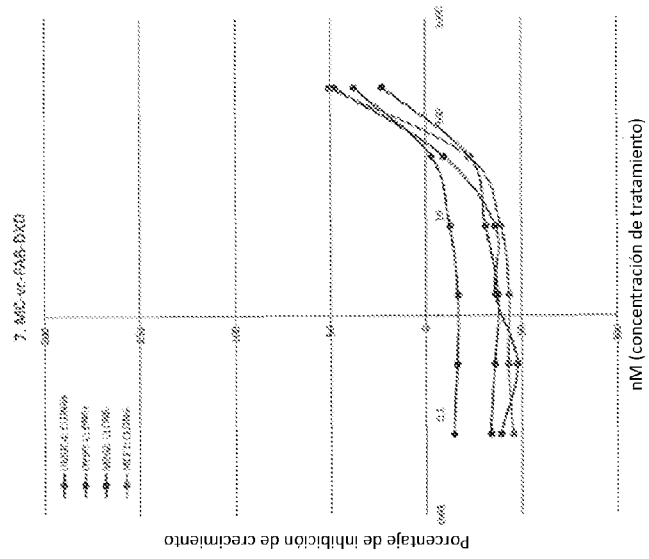


FIG. 39H

ARK2

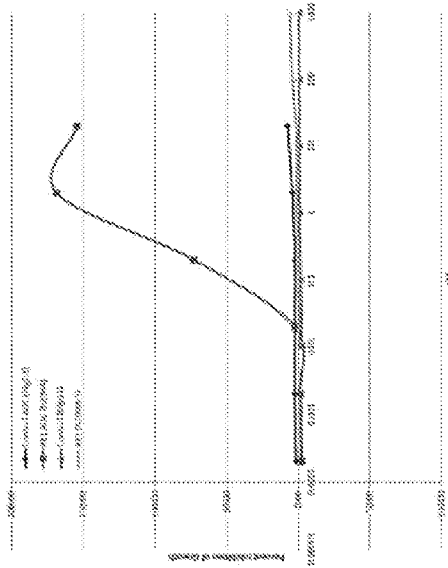


FIG. 39I

OVCA429

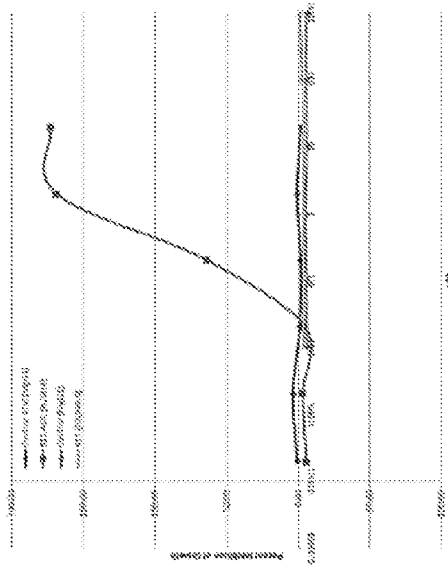


FIG. 39J

H841

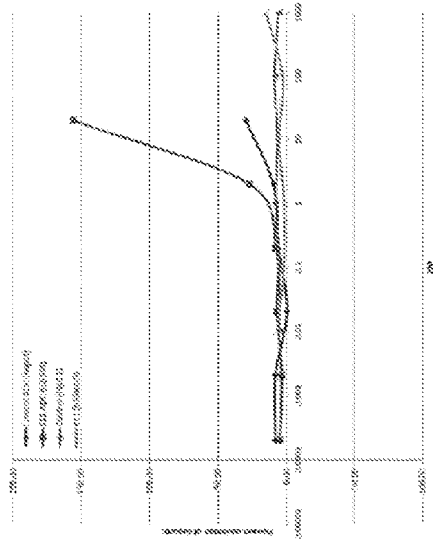


FIG. 39K

OV90

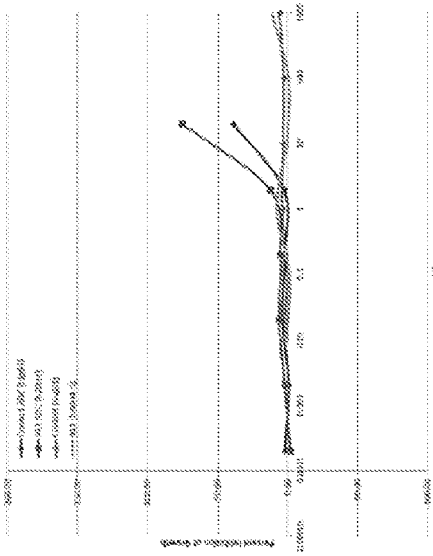


FIG. 39L

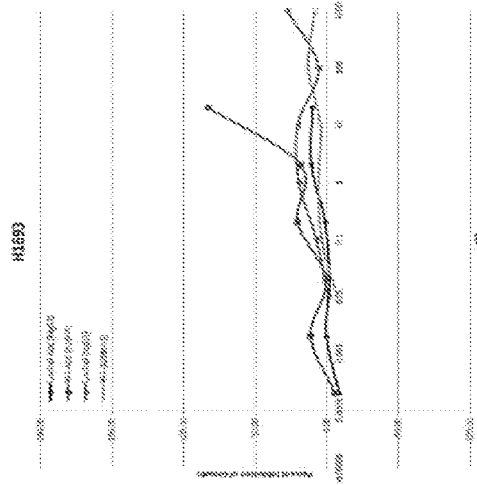


FIG. 39M

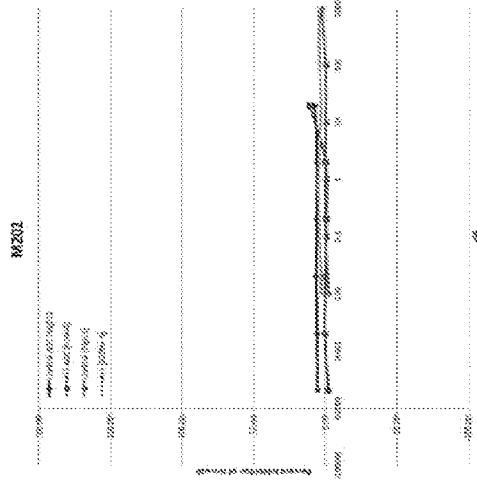
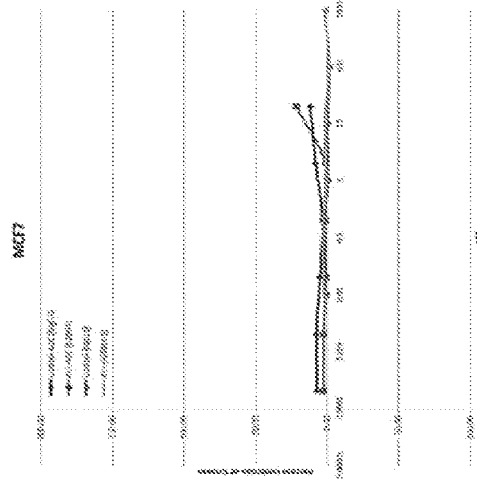
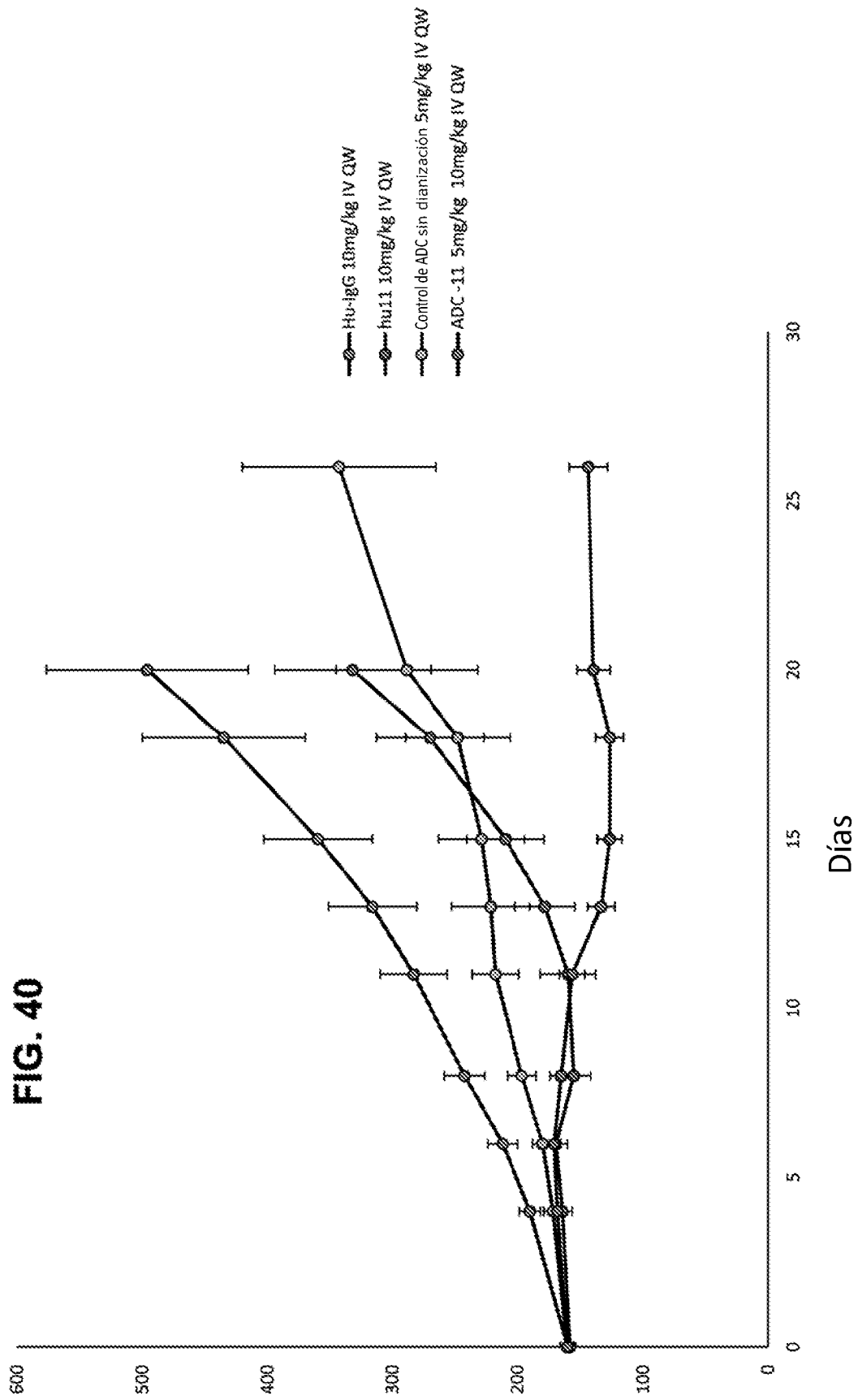


FIG. 39N





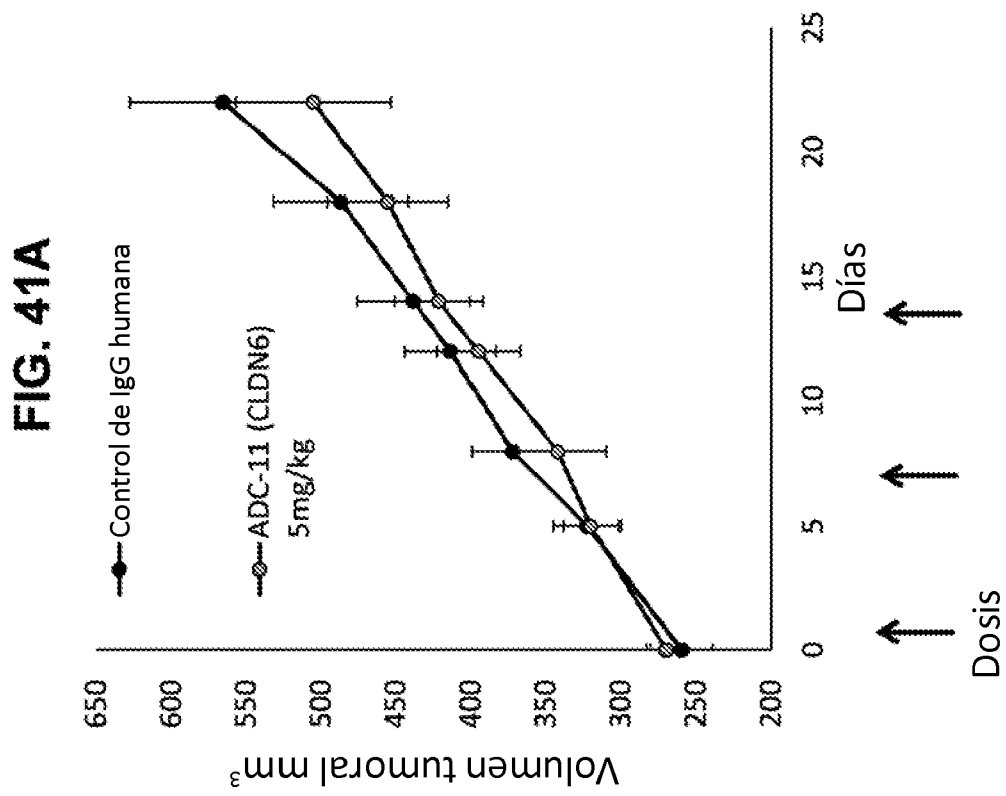
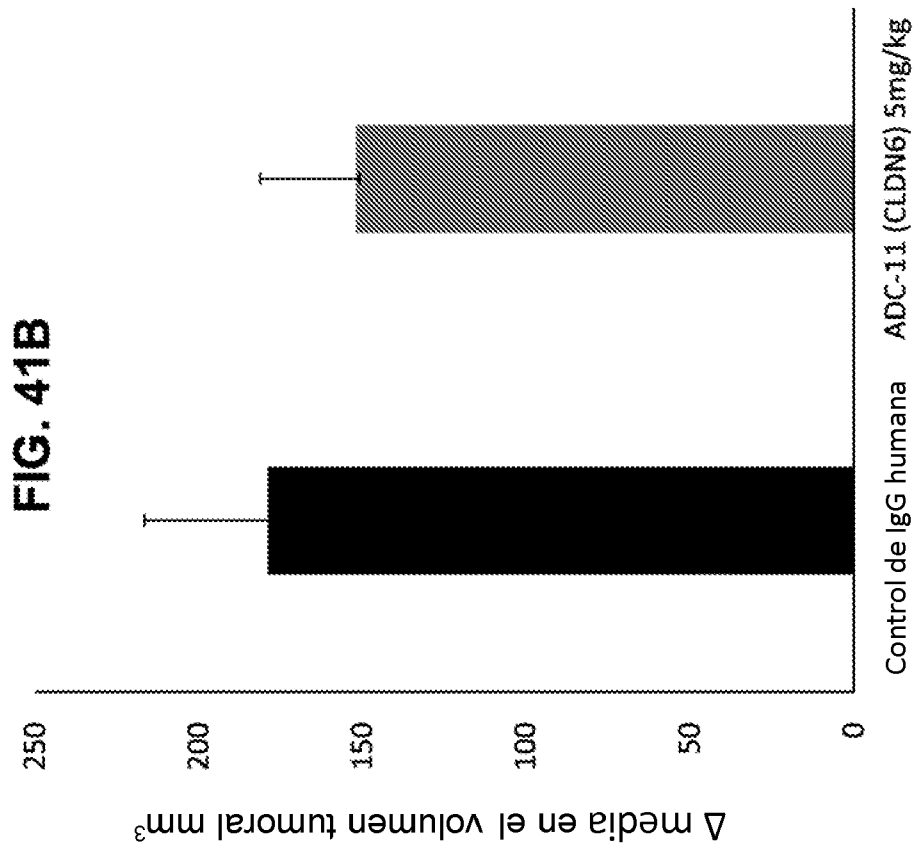


FIG. 42B

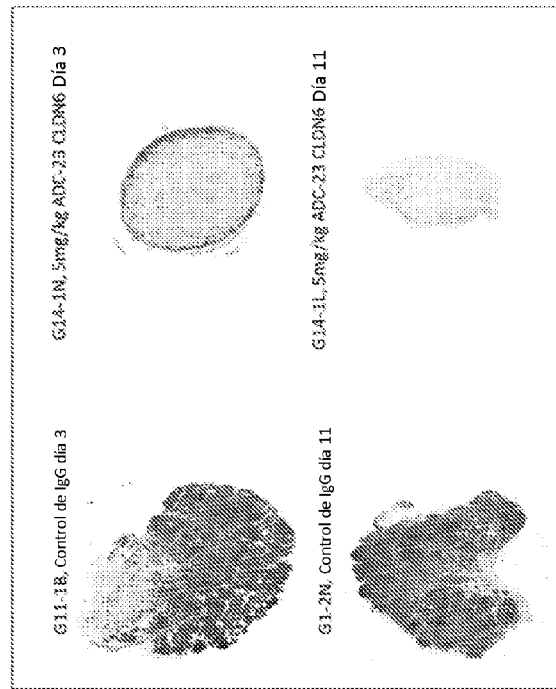


FIG. 42A

