

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 607**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13	(2006.01)	C12N 1/15	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)	C12N 1/19	(2006.01)
A61K 31/4745	(2006.01)	C12N 1/21	(2006.01)
A61K 31/395	(2006.01)	C12N 5/10	(2006.01)
A61K 47/68	(2007.01)	C12P 21/08	(2006.01)
A61P 13/12	(2006.01)	A61K 9/08	(2006.01)
A61P 15/08	(2006.01)	A61K 9/19	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)		
A61P 43/00	(2006.01)		
C07K 16/28	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2018** **PCT/JP2018/018572**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.11.2018** **WO18212136**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2018** **E 18802536 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024** **EP 3626825**

54 Título: **Anticuerpo anti-CDH6 y conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco**

30 Prioridad:

15.05.2017 JP 2017096749

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

04.12.2024

73 Titular/es:

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1, Nihonbashi Honcho Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP

72 Inventor/es:

SAITO ATSUKO;
HIRATA TSUYOSHI y
NAKAMURA KENSUKE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 991 607 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

Anticuerpo anti-CDH6 y conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CDH6 que se une a CDH6 y que tiene un efecto de internalización, a un método para producir el anticuerpo anti-CDH6, a un conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende el anticuerpo, un agente antitumoral que comprende el conjugado de anticuerpo y fármaco, y similares.

10 **Técnica anterior**

Las cadherinas son glucoproteínas presentes en la superficie de las membranas celulares y funcionan como moléculas de adhesión célula-célula a través de la unión dependiente de iones de calcio de sus dominios extracelulares N-terminales, o como moléculas de señal responsables de la interacción célula-célula. Las cadherinas clásicas pertenecen a la superfamilia de las cadherinas y son proteínas transmembrana de un solo paso compuestas por cinco dominios extracelulares (dominios EC), una región transmembrana y un dominio intracelular. Las cadherinas clásicas se clasifican en la familia tipo I caracterizada por la E-cadherina y la N-cadherina, y la familia tipo II de acuerdo con las homologías de sus secuencias de aminoácidos.

La cadherina-6 (CDH6) es una proteína transmembrana de un solo paso compuesta por 790 aminoácidos, que se clasifica en la familia de cadherinas tipo II, y esta proteína tiene dominios extracelulares N-terminales e intracelulares C-terminales. El gen CDH6 humano se clonó por primera vez en 1995 (Bibliografía no de patentes 1) y su secuencia puede consultarse en, por ejemplo, los N.º de registro NM_004932 y NP_004923 (NCBI).

CDH6 se expresa específicamente en el cerebro o el riñón en la etapa de desarrollo y se ha informado que juega un papel importante en la formación del circuito del sistema nervioso central (Bibliografía no de patentes 2 y 3) y el desarrollo de la nefrona en el riñón (Bibliografía no de patentes 4 y 5). La expresión de CDH6 en los tejidos normales de los humanos adultos se localiza en los túbulos del riñón, las células epiteliales del conducto biliar y similares.

Mientras tanto, se sabe que CDH6 se sobreexpresa específicamente en sitios tumorales en algunos tipos de cánceres en adultos humanos. Se ha informado sobre la correlación de la expresión de CDH6 con un mal pronóstico y su aplicabilidad como marcador tumoral con respecto al carcinoma de células renales humano, particularmente, carcinoma renal de células claras (Bibliografía no de patentes 6 y 7). También se ha informado de la alta expresión de CDH6 con respecto al cáncer de ovario humano (Bibliografía no de patentes 8). También se ha informado que CDH6 está implicado en la transición epitelial-mesenquimal del cáncer de tiroides humano (Bibliografía no de patentes 9). Adicionalmente, se ha informado que CDH6 también se expresa en el cáncer de los conductos biliares humanos y en el cáncer de pulmón microcítico humano (Bibliografía no de patentes 12 y 13).

Los cánceres ocupan un lugar destacado entre las causas de muerte. Aunque se espera que el número de pacientes con cáncer aumente con el envejecimiento de la población, las necesidades de tratamiento aún no han sido suficientemente satisfechas. Los problemas de los tratamientos quimioterapéuticos convencionales son que: debido a su baja selectividad, estos quimioterapéuticos son tóxicos no solo para las células tumorales sino también para las células normales y, por lo tanto, tienen reacciones adversas; y los quimioterapéuticos no pueden administrarse en cantidades suficientes y, por lo tanto, no pueden producir sus efectos de manera suficiente. Por consiguiente, en los últimos años, se han desarrollado fármacos de dianas moleculares o fármacos de anticuerpos más selectivos, que se dirigen a moléculas que presentan mutaciones o una alta expresión característica en las células cancerosas o moléculas específicas implicadas en la transformación maligna de las células.

Los anticuerpos son altamente estables en la sangre y se unen específicamente a sus antígenos diana. Por estas razones, se espera una reducción de las reacciones adversas y se ha desarrollado una gran cantidad de fármacos de anticuerpos para moléculas altamente expresadas en la superficie de las células cancerosas. Una de las técnicas que se basan en la capacidad de unión específica del antígeno de los anticuerpos es usar un conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC). El ADC es un conjugado en el cual un anticuerpo que se une a un antígeno expresado en la superficie de las células cancerosas y que puede internalizar el antígeno en la célula a través de la unión se conjuga con un fármaco que tiene actividad citotóxica. El ADC puede suministrar eficazmente el fármaco a las células cancerosas y, por lo tanto, puede esperarse que destruya las células cancerosas acumulando el fármaco en las células cancerosas (Bibliografía no de patentes 10 y Bibliografía de patentes 1 y 2). Con respecto a los ADC, por ejemplo, Adcetris(TM) (brentuximab vedotina), que comprende un anticuerpo monoclonal anti-CD30 conjugado con monometil auristatina E, se ha aprobado como un fármaco terapéutico para el linfoma de Hodgkin y el linfoma anaplásico de células grandes. También, Kadcyla(TM) (trastuzumab emtansina) que comprende un anticuerpo monoclonal anti-HER2 conjugado con emtansina se usa en el tratamiento del cáncer de mama progresivo o recurrente positivo para HER2.

Las características de un antígeno diana adecuado para el ADC como un fármaco antitumoral son que: el antígeno se expresa de forma específica y elevada en la superficie de las células cancerosas, pero tiene una expresión baja o no se expresa en las células normales; el antígeno puede internalizarse en las células; el antígeno no se secreta desde

la superficie celular; etc. La capacidad de internalización del anticuerpo depende de las propiedades tanto del antígeno diana como del anticuerpo. Es difícil predecir un sitio de unión de antígeno adecuado para la internalización a partir de la estructura molecular de una diana o predecir un anticuerpo que tenga alta capacidad de internalización a partir de la fuerza de unión, las propiedades físicas y similares del anticuerpo. Por consiguiente, un desafío importante en el desarrollo de ADC que tenga alta eficacia es obtener un anticuerpo que tenga alta capacidad de internalización contra el antígeno diana (Bibliografía no de patentes 11).

Los ADC que comprenden DM4 conjugado con un anticuerpo anti-CDH6 que se une específicamente al dominio EC 5 (EC5) de CDH6 se conocen como ADC dirigidos a CDH6 (Bibliografía de patentes 3).

Listado de citas

Bibliografía de patentes

Bibliografía de patentes 1: WO2014/057687
Bibliografía de patentes 2: US2016/0297890
Bibliografía de patentes 3: WO2016/024195

Bibliografía no de patentes

Bibliografía no de patentes 1: Shimoyama Y, *et al.*, Cancer Research, 2206-2211, 55, 15 de mayo de 1995
Bibliografía no de patentes 2: Inoue T, *et al.*, Developmental Biology, 183-194, 1997
Bibliografía no de patentes 3: Osterhout J A, *et al.*, Neuron, 632-639, 71, 25 de agosto de 2011
Bibliografía no de patentes 4: Cho E A, *et al.*, Development, 803-812, 125, 1998
Bibliografía no de patentes 5: Mah S P, *et al.*, Developmental Biology, 38-53, 223, 2000
Bibliografía no de patentes 6: Paul R, *et al.*, Cancer Research, 2741-2748, 1 de julio, 57, 1997
Bibliografía no de patentes 7: Shimazui T, *et al.*, Cancer, 963-968, 101(5), 1 de sept. de 2004
Bibliografía no de patentes 8: Koebel M, *et al.*, PLoS Medicine, 1749-1760, 5(12), e232, dic. de 2008
Bibliografía no de patentes 9: Gugnioni M, *et al.*, Oncogene, 667-677, 36, 2017
Bibliografía no de patentes 10: Polakis P., Pharmacological Reviews, 3-19, 68, 2016
Bibliografía no de patentes 11: Peters C, *et al.*, Bioscience Reports, 1-20, 35, 2015
Bibliografía no de patentes 12: Goeppert B, *et al.*, Epigenetics, 780-790, 11(11), 2016
Bibliografía no de patentes 13: Yokoi S, *et al.*, American Journal of Pathology, 207-216, 161, 1, 2002

Sumario de la invención

Problema técnico

Es un objeto de la presente invención proporcionar un anticuerpo que se une específicamente a CDH6 y que tiene una alta actividad de internalización, un conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende el anticuerpo y que tiene una alta actividad antitumoral, un producto farmacéutico que comprende el conjugado de anticuerpo y fármaco y que tiene efectos terapéuticos sobre un tumor, un método para tratar un tumor usando el anticuerpo, el conjugado de anticuerpo y fármaco o el producto farmacéutico, y similares.

Solución al problema

Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos encaminados a lograr el objeto descrito anteriormente y han descubierto que, sorprendentemente, un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular 3 (en la presente descripción, también denominado EC3) de CDH6 tiene una actividad de internalización extremadamente alta contra las células que expresan CDH6 y es útil como anticuerpo para ADC. Los inventores han descubierto además que un conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco que comprende el anticuerpo anti-CDH6 mencionado anteriormente conjugado con un fármaco que ejerce toxicidad en las células a través de un enlazador que tiene una estructura específica exhibe una actividad antitumoral más fuerte que la de los conjugados de CDH6-fármaco convencionales.

La presente invención incluye los siguientes aspectos de la invención:

- [1] un anticuerpo que se une específicamente a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 y que tiene capacidad de internalización que permite la captación celular, o un fragmento funcional del anticuerpo;
- [2] el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con [1], que tiene actividad inhibitoria competitiva, para unirse a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4, contra al menos un anticuerpo cualquiera seleccionado del grupo que consiste en los siguientes anticuerpos (1) a (5):

(1) un anticuerpo que tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 53 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 56,

(2) un anticuerpo que tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 69,

(3) un anticuerpo que tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73,

(4) un anticuerpo que tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 65 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73 y

(5) un anticuerpo que tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 77;

[3] el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con [1] o [2], que comprende CDRL1, CDRL2 y CDRL3 en una combinación cualquiera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes combinaciones (1) a (4):

(1) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14,

(2) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 24,

(3) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 32, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 33 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34 y

(4) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 42, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44 y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 en una combinación cualquiera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes combinaciones (5) a (9):

(5) CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19,

(6) CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 27, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 28 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 29,

(7) CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 37, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 38 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 39,

(8) CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 47, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 48 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 49 y

(9) CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19;

[4] el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], que comprende CDRL1, CDRL2 y CDRL3 y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 en cualquier combinación seleccionada del grupo que consiste en las siguientes combinaciones (1) a (5):

(1) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14 y CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19,

(2) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 24 y CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 27, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 28 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 29,

(3) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 32, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 33 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34 y CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 37, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 38 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 39,

(4) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 42, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44 y CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 47, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 48 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 49 y

(5) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14 y CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19;

[5] el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4], que está humanizado;

[6] el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], que tiene una región variable de cadena ligera cualquiera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes regiones variables (1) a (4):

(1) una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 63,

(2) una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 67,

(3) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % o más con la secuencia de una región marco distinta a cada secuencia CDR en las secuencias de aminoácidos de (1) y (2) y

(4) una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, una sustitución o una adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de una región marco distinta a cada secuencia CDR en las secuencias de aminoácidos de (1) a (3), y una región variable de cadena pesada cualquiera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes regiones variables (5) a (9):

(5) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 71,

(6) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 75,

(7) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 79,

(8) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia de al menos el 95 % o más con la secuencia de una región marco distinta a cada secuencia CDR en las secuencias de aminoácidos de (5) a (7) y

(9) una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, una sustitución o una adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de una región marco distinta a cada secuencia CDR en las secuencias de aminoácidos de (5) a (8);

[7] el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [6], que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada en cualquiera de las siguientes combinaciones (1) a (4):

(1) una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 63 y una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 71,

(2) una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 63 y una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 75,

(3) una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 67 y una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 75 y

(4) una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 63 y una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 79;

[8] el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [7], que tiene cualquiera de las siguientes combinaciones (1) a (4):

(1) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 69,

(2) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO:

- 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73,
- (3) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 65 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73 y
- (4) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 77;
- [9] el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con [8], que tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 69;
- [10] el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con [8], que tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73;
- [11] el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con [8], que tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 65 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73;
- [12] el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con [8], que tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 77;
- [13] el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [12], en donde el fragmento funcional se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fab' y Fv;
- [14] un polinucleótido que codifica el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [13];
- [15] el polinucleótido de acuerdo con [14], que comprende polinucleótidos en una combinación cualquiera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes combinaciones (1) a (5):
- (1) un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19,
- (2) un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 24, y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 27, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 28 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 29,
- (3) un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 32, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 33 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34, y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 37, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 38 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 39,
- (4) un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 42, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44, y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 47, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 48 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 49 y
- (5) un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19;
- [16] el polinucleótido de acuerdo con [14] o [15], que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y un polinucleótido

que codifica una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 69;

[17] el polinucleótido de acuerdo con [14] o [15], que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y un polinucleótido que codifica una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73;

[18] el polinucleótido de acuerdo con [14] o [15], que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 65 y un polinucleótido que codifica una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73;

[19] el polinucleótido de acuerdo con [14] o [15], que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y un polinucleótido que codifica una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 77;

[20] un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con uno cualquiera de [14] a [19];

[21] células hospedadoras transformadas con el vector de expresión de acuerdo con [20];

[22] las células hospedadoras de acuerdo con [21], en donde las células hospedadoras son células eucariotas;

[23] un método para producir un anticuerpo de interés o un fragmento funcional del anticuerpo, que comprende la etapa de cultivar las células hospedadoras de acuerdo con [21] o [22] y la etapa de recoger un anticuerpo de interés o un fragmento funcional del anticuerpo del cultivo obtenido mediante la etapa mencionada anteriormente;

[24] el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [13], en donde la cadena pesada o la cadena ligera han sido sometidas una o dos o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en glucosilación ligada a N, glucosilación ligada a O, procesamiento N-terminal, procesamiento C-terminal, desamidación, isomerización de ácido aspártico, oxidación de metionina, adición de un resto de metionina al extremo N, amidación de un resto de prolina, conversión de glutamina N-terminal o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico y una eliminación de uno o dos aminoácidos del extremo carboxilo;

[25] el anticuerpo de acuerdo con [24], en donde uno o dos aminoácidos se eliminan del extremo carboxilo de una cadena pesada del mismo;

[26] el anticuerpo de acuerdo con [25], en donde se elimina un aminoácido de cada uno de los extremos carboxilo de ambas cadenas pesadas del mismo;

[27] el anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [24] a [26], en donde un resto de prolina en el extremo carboxilo de una cadena pesada del mismo está además amidado;

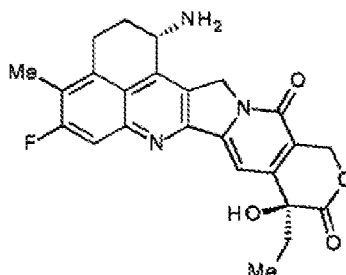
[28] el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [13] y [24] a [27], en donde la modificación de la cadena de azúcar se regula para potenciar la actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpos;

[29] un conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [13] y [24] a [28] conjugado con un fármaco;

[30] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con [29], en donde el fármaco es un compuesto antitumoral;

[31] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con [30], en donde el compuesto antitumoral es un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 1]



[32] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [31], en donde el anticuerpo está conjugado con el fármaco a través de un enlazador que tiene cualquier estructura seleccionada del grupo que consiste en las siguientes fórmulas (a) a (f):

(a) - (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

(b) - (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,

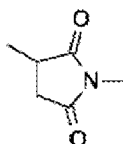
(c) - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

(d) - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O) -GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

(e) - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)- y

(f) $-(\text{Succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$, en donde el anticuerpo está conectado al extremo de $-(\text{Succinimid-3-il-N})$, el compuesto antitumoral está conectado al grupo carbonilo de la fracción $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ de (a), (b), (e) o (f), la fracción $\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ de (c) o la fracción $\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ de (d) con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como una posición de conexión, GGFG representa una secuencia de aminoácidos que consiste en glicina-glicina-fenilalanina-glicina enlazadas a través de enlaces peptídicos, y $-(\text{Succinimid-3-il-N})-$ tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 2]



que está conectado al anticuerpo en la posición 3 del mismo y está conectado a un grupo metileno en la estructura enlazadora que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1;

[33] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [32], en donde el enlazador está representado por cualquier fórmula seleccionada del grupo que consiste en las siguientes fórmulas (c), (d) y (e):

(c) $-(\text{Succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$,

(d) $-(\text{Succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ y

(e) $-(\text{Succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$;

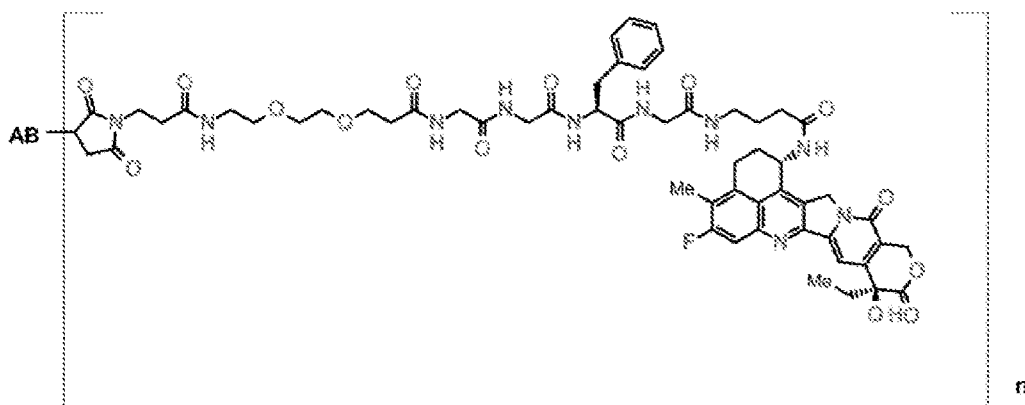
[34] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [33], en donde el enlazador está representado por la siguiente fórmula (c) o (e):

(c) $-(\text{Succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ y

(e) $-(\text{Succinimid-3-il-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$;

[35] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [34], que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

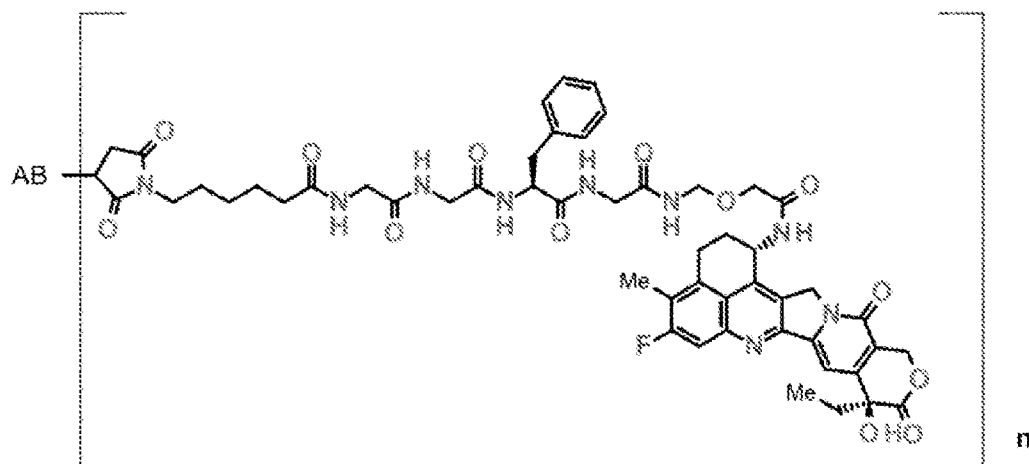
[Fórmula 3]



en donde AB representa el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo, n representa el número promedio de unidades de la estructura del enlazador del fármaco conjugada al anticuerpo por anticuerpo, y el anticuerpo está conectado al enlazador a través de un grupo sulfhidrido derivado del anticuerpo;

[36] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [34], que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 4]



en donde AB representa el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo, n representa el número promedio de unidades de la estructura del enlazador del fármaco conjugada al anticuerpo por anticuerpo, y el anticuerpo está conectado al enlazador a través de un grupo sulfhidrido derivado del anticuerpo;

[37] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [36], en donde el anticuerpo es un anticuerpo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada en una combinación cualquiera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes combinaciones (1) a (4), o un fragmento funcional del anticuerpo:

(1) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 69,

(2) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73,

(3) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 65 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73 y

(4) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 77;

[38] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con [37], en donde el anticuerpo es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 69, o un fragmento funcional del anticuerpo;

[39] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con [37], en donde el anticuerpo es un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 77, o un fragmento funcional del anticuerpo;

[40] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [39], en donde la cadena pesada o la cadena ligera han sido sometidas una o dos o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en glucosilación ligada a N, glucosilación ligada a O, procesamiento N-terminal, procesamiento C-terminal, desamidación, isomerización de ácido aspártico, oxidación de metionina, adición de un resto de metionina al extremo N, amidación de un resto de prolina, conversión de glutamina N-terminal o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico y una eliminación de uno o dos aminoácidos del extremo carboxilo;

[41] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [40], en donde el número promedio de unidades de la estructura de enlazador de fármaco seleccionada conjugadas por anticuerpo está en el intervalo de 1 a 10;

[42] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con [41], en donde el número promedio de unidades de la estructura de enlazador de fármaco seleccionada conjugadas por anticuerpo está en el intervalo de 2 a 8;

[43] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con [42], en donde el número promedio de unidades de la estructura de enlazador de fármaco seleccionada conjugadas por anticuerpo está en el intervalo de 5 a 8;

[44] el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con [43], en donde el número promedio de unidades de la

estructura de enlazador de fármaco seleccionada conjugadas por anticuerpo está en el intervalo de 7 a 8;

[45] una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [44], una sal del mismo o un hidrato del conjugado o de la sal;

[46] la composición farmacéutica de acuerdo con [45], que es un fármaco antitumoral;

[47] la composición farmacéutica de acuerdo con [46], en donde el tumor es un tumor que expresa CDH6;

[48] la composición farmacéutica de acuerdo con [46] o [47], en donde el tumor es carcinoma de células renales, carcinoma renal de células claras, carcinoma de células renales papilares, cáncer de ovario, adenocarcinoma seroso de ovario, cáncer de tiroides, cáncer de las vías biliares, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, glioblastoma, mesotelioma, cáncer uterino, cáncer pancreático, tumor de Wilms o neuroblastoma;

[49] un método para tratar un tumor, que comprende administrar cualquier componente seleccionado del conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [44], una sal del mismo o un hidrato del conjugado o de la sal a un individuo;

[50] el método de tratamiento de acuerdo con [49], en donde el tumor es un tumor que expresa CDH6;

[51] el método de tratamiento de acuerdo con [49] o [50], en donde el tumor es carcinoma de células renales, carcinoma renal de células claras, carcinoma de células renales papilares, cáncer de ovario, adenocarcinoma seroso de ovario, cáncer de tiroides, cáncer de las vías biliares, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, glioblastoma, mesotelioma, cáncer uterino, cáncer pancreático, tumor de Wilms o neuroblastoma;

[52] un método para tratar un tumor, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende al menos un componente seleccionado del conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con uno cualquiera de [29] a [44], una sal del mismo y un hidrato del conjugado o de la sal y al menos un fármaco antitumoral a un individuo, simultánea, separada o continuamente;

[53] un método para producir un conjugado de anticuerpo y fármaco, que comprende la etapa de hacer reaccionar el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [13] y [24] a [28], o un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo obtenido mediante el método de producción de acuerdo con [23] con un compuesto intermedio enlazador de fármaco; y

[54] un método para producir un conjugado de anticuerpo y fármaco, que comprende la etapa de cultivar las células hospedadoras de acuerdo con [21] o [22], la etapa de recoger un anticuerpo de interés o un fragmento funcional del anticuerpo del cultivo obtenido mediante la etapa mencionada anteriormente y la etapa de hacer reaccionar el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo obtenido mediante la etapa mencionada anteriormente con un compuesto intermedio enlazador de fármaco.

Efectos ventajosos de la invención

Las características del anticuerpo anti-CDH6 de la presente invención son reconocer específicamente el dominio EC 3 (EC3) de CDH6 y tener una alta actividad de internalización. Puede esperarse que un conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco que comprende el anticuerpo anti-CDH6 de la presente invención conjugado con un fármaco que ejerce toxicidad en las células a través de un enlazador que tiene una estructura específica logre un excelente efecto antitumoral y seguridad mediante la administración a pacientes que tienen células cancerosas que expresan CDH6. Específicamente, el conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco de la presente invención es útil como un agente antitumoral.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La Figura 1 muestra los resultados de la citometría de flujo del examen de la unión de cuatro anticuerpos monoclonales anti-CDH6 de rata (clones n.º rG019, rG055, rG056 y rG061) o control de IgG de rata a células control o células 293T transfectadas con hCDH6. La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de FITC, que indica la cantidad de anticuerpo unido, y la ordenada representa el recuento celular.

[Figura 2-1] La Figura 2-1 muestra la actividad de unión de cuatro anticuerpos monoclonales anti-CDH6 de rata (rG019, rG055, rG056 y rG061) o anticuerpo de control negativo IgG2b de rata contra células control o células 293 transfectadas con hCDH6 de longitud completa. La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de FITC, que indica la cantidad de anticuerpo unido, y la ordenada representa el recuento celular.

[Figura 2-2] La Figura 2-2 muestra la actividad de unión de cuatro anticuerpos monoclonales anti-CDH6 de rata (rG019, rG055, rG056 y rG061) o control de IgG de rata contra células control o células 293 transfectadas con hCDH6 con EC1 eliminado. La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de FITC, que indica la cantidad de anticuerpo unido, y la ordenada representa el recuento celular.

[Figura 2-3] La Figura 2-3 muestra la actividad de unión de cuatro anticuerpos monoclonales anti-CDH6 de rata (rG019, rG055, rG056 y rG061) o control de IgG de rata contra células control o células 293 transfectadas con hCDH6 con EC2 eliminado. La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de FITC, que indica la cantidad de anticuerpo unido, y la ordenada representa el recuento celular.

[Figura 2-4] La Figura 2-4 muestra la actividad de unión de cuatro anticuerpos monoclonales anti-CDH6 de rata (rG019, rG055, rG056 y rG061) o control de IgG de rata contra células control o células 293 transfectadas con hCDH6 con EC3 eliminado. La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de FITC, que indica la cantidad de anticuerpo unido, y la ordenada representa el recuento celular.

[Figura 2-5] La Figura 2-5 muestra la actividad de unión de cuatro anticuerpos monoclonales anti-CDH6 de rata (rG019, rG055, rG056 y rG061) o control de IgG de rata contra células control o células 293 transfectadas con hCDH6 con EC4 eliminado. La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de FITC, que indica la cantidad

de anticuerpo unido, y la ordenada representa el recuento celular.

[Figura 2-6] La Figura 2-6 muestra la actividad de unión de cuatro anticuerpos monoclonales anti-CDH6 de rata (rG019, rG055, rG056 y rG061) o control de IgG de rata contra células control o células 293 transfectadas con hCDH6 con EC5 eliminado. La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de FITC, que indica la cantidad de anticuerpo unido, y la ordenada representa el recuento celular.

[Figura 3] La Figura 3 muestra los resultados de la citometría de flujo de la evaluación de la expresión de CDH6 en la superficie de la membrana celular de 4 tipos de líneas de células tumorales humanas (líneas de células tumorales de ovario NIH:OVCAR-3, PA-1, y ES-2 y línea celular de tumor de células renales humanas 786-O). La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de FITC, que indica la cantidad de anticuerpo unido, y la ordenada representa el recuento celular.

[Figura 4] La Figura 4 muestra un gráfico en el cual la actividad de internalización de 4 tipos de anticuerpos anti-CDH6 de rata (rG019, rG055, rG056 y rG061) o control IgG de rata se evaluó en células NIH:OVCAR-3 y células 786-O usando el reactivo anti-IgG de rata ZAP de rata conjugado con una toxina (saporina) que inhibe la síntesis de proteínas, o cabra anti-IgG de rata, Fragmento Específico Fc (gamma) no conjugado con la toxina como un control negativo. La ordenada del gráfico representa la actividad de ATP (ULR). Una tasa de supervivencia celular (%), calculado como una tasa de supervivencia relativa cuando el número de células vivas en un pocillo suplementado con el control negativo en lugar de ZAP de rata se definió como el 100 %, se muestra debajo de cada gráfico.

[Figura 5] La Figura 5 muestra la unión del anticuerpo anti-CDH6 quimérico humano hG019 al CDH6 humano y al CDH6 de mono. La abscisa representa la concentración de anticuerpos y la ordenada representa la cantidad de anticuerpo unido basado en la intensidad de fluorescencia media.

[Figura 6-1] Las Figuras 6-1 y 6-2 muestran cada una la actividad de unión de cuatro anticuerpos humanizados hG019 (H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02) o un anticuerpo de control negativo IgG1 humano contra CDH6 humano, CDH6 de mono, CDH6 de ratón y CDH6 de rata. La abscisa representa la concentración de anticuerpos y la ordenada representa la cantidad del anticuerpo unido basado en la intensidad de fluorescencia media.

[Figura 6-2] Las Figuras 6-1 y 6-2 muestran cada una la actividad de unión de cuatro anticuerpos humanizados hG019 (H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02) o anticuerpo de control negativo IgG1 humano contra CDH6 humano, CDH6 de mono, CDH6 de ratón y CDH6 de rata. La abscisa representa la concentración de anticuerpos y la ordenada representa la cantidad del anticuerpo unido basado en la intensidad de fluorescencia media.

[Figura 7-1] La Figura 7-1 muestra la actividad de unión de cuatro anticuerpos humanizados hG019 (H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02), anticuerpo anti-CDH6 NOV0712 o anticuerpo de control negativo hlgG1 contra células control o células 293α transfectadas con hCDH6 de longitud completa. La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de APC indicando la cantidad del anticuerpo unido. La ordenada representa el recuento celular.

[Figura 7-2] La Figura 7-2 muestra la actividad de unión de cuatro anticuerpos humanizados hG019 (H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02), anticuerpo anti-CDH6 NOV0712 o anticuerpo de control negativo hlgG1 contra células control o células 293α transfectadas con hCDH6 con EC1 eliminado. La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de APC indicando la cantidad del anticuerpo unido. La ordenada representa el recuento celular.

[Figura 7-3] La Figura 7-3 muestra la actividad de unión de cuatro anticuerpos humanizados hG019 (H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02), anticuerpo anti-CDH6 NOV0712 o anticuerpo de control negativo hlgG1 contra células control o células 293α transfectadas con hCDH6 con EC2 eliminado. La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de APC indicando la cantidad del anticuerpo unido. La ordenada representa el recuento celular.

[Figura 7-4] La Figura 7-4 muestra la actividad de unión de cuatro anticuerpos humanizados hG019 (H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02), anticuerpo anti-CDH6 NOV0712 o anticuerpo de control negativo hlgG1 contra células control o células 293α transfectadas con hCDH6 con EC3 eliminado. La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de APC indicando la cantidad del anticuerpo unido. La ordenada representa el recuento celular.

[Figura 7-5] La Figura 7-5 muestra la actividad de unión de cuatro anticuerpos humanizados hG019 (H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02), anticuerpo anti-CDH6 NOV0712 o control negativo hlgG1 contra células control o células 293α transfectadas con hCDH6 con EC4 eliminado. La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de APC indicando la cantidad del anticuerpo unido. La ordenada representa el recuento celular.

[Figura 7-6] La Figura 7-6 muestra la actividad de unión de cuatro anticuerpos humanizados hG019 (H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02), anticuerpo anti-CDH6 NOV0712 o control negativo hlgG1 contra células control o células 293α transfectadas con hCDH6 con EC5 eliminado. La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de APC indicando la cantidad del anticuerpo unido. La ordenada representa el recuento celular.

[Figura 8] La Figura 8 muestra los resultados de la citometría de flujo del examen de la expresión de CDH6 humano en la línea celular que expresa de manera estable 786-O/hCDH6 y su línea celular progenitora 786-O. La abscisa representa la intensidad de fluorescencia de Alexa Fluor 647, que indica la cantidad de anticuerpo unido, y la ordenada representa un recuento celular.

[Figura 9] La Figura 9 muestra el ensayo de competición de unión de cuatro anticuerpos hG019 humanizados no marcados (H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02), anticuerpo anti-CDH6 NOV0712 o control negativo hlgG1 usando (a) NOV0712 marcado o (b) H01L02 marcado. La abscisa representa la concentración final del anticuerpo no marcado añadido y la ordenada representa la cantidad de anticuerpo unido en función de la intensidad de fluorescencia media.

[Figura 10-1] La Figura 10-1 muestra un gráfico en el cual la actividad de internalización de cuatro anticuerpos humanizados hG019 (H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02), anticuerpo anti-CDH6 NOV0712 y un anticuerpo de control negativo se evaluaron en células NIH:OVCAR-3 usando el reactivo anti-IgG humana ZAP humano conjugado con una toxina (saporina) que inhibe la síntesis de proteínas, o fragmento F(ab')2 de cabra anti-IgG

humana, Fragmento Específico Fc (gamma) no conjugado con la toxina como un control negativo. La ordenada del gráfico representa la actividad de ATP (ULR). Una tasa de supervivencia celular (%), calculado como una tasa de supervivencia relativa cuando el número de células vivas en un pocillo suplementado con el control negativo en lugar de ZAP humano se definió como el 100 %, se muestra debajo de cada gráfico.

[Figura 10-2] La Figura 10-2 muestra un gráfico en el cual la actividad de internalización de cuatro anticuerpos humanizados hG019 (H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02), anticuerpo anti-CDH6 NOV0712 y un anticuerpo de control negativo se evaluaron en células 786-O usando el reactivo anti-IgG humana ZAP humano conjugado con una toxina (saporina) que inhibe la síntesis de proteínas, o fragmento F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana, Fragmento Específico Fc (gamma) no conjugado con la toxina como un control negativo. La ordenada del gráfico representa la actividad de ATP (ULR). Una tasa de supervivencia celular (%), calculado como una tasa de supervivencia relativa cuando el número de células vivas en un pocillo suplementado con el control negativo en lugar de ZAP humano se definió como el 100 %, se muestra debajo de cada gráfico.

[Figura 10-3] La Figura 10-3 muestra un gráfico en el cual la actividad de internalización de cuatro anticuerpos humanizados hG019 (H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02), anticuerpo anti-CDH6 NOV0712 y un anticuerpo de control negativo se evaluaron en células PA-1 usando el reactivo anti-IgG humana ZAP humano conjugado con una toxina (saporina) que inhibe la síntesis de proteínas, o fragmento F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana, Fragmento Específico Fc (gamma) no conjugado con la toxina como un control negativo. La ordenada del gráfico representa la actividad de ATP (ULR). Una tasa de supervivencia celular (%), calculado como una tasa de supervivencia relativa cuando el número de células vivas en un pocillo suplementado con el control negativo en lugar de ZAP humano se definió como el 100 %, se muestra debajo de cada gráfico.

[Figura 11] La Figura 11 muestra los resultados de la evaluación de la actividad de inhibición del crecimiento celular *in vitro* de cuatro conjugados humanizados hG019-fármaco (H01L02-DXd, H02L02-DXd, H02L03-DXd y H04L02-DXd) o NOV0712-DM4 contra células PA-1. La abscisa representa la concentración de conjugado de anticuerpo y fármaco y la ordenada representa la tasa de supervivencia celular (%).

[Figura 12] La Figura 12 muestra los efectos antitumorales *in vivo* de cuatro conjugados humanizados hG019-fármaco (H01L02-DXd, H02L02-DXd, H02L03-DXd y H04L02-DXd) o NOV0712-DM4. La evaluación se llevó a cabo usando modelos animales en los cuales se inoculó la línea 786-O de células tumorales renales humanas positivas para CDH6 en ratones inmunodeficientes. La abscisa representa el número de días y la ordenada representa el volumen tumoral. El intervalo de error representa un valor de error típico (SE).

[Figura 13] La Figura 13 muestra los efectos antitumorales *in vivo* del conjugado humanizado hG019-fármaco H01L02-DXd o NOV0712-DM4 o NOV0712-DXd. La evaluación se llevó a cabo usando modelos animales en los cuales se inoculó la línea PA-1 de células tumorales de ovario humanas positivas para CDH6 en ratones inmunodeficientes. La abscisa representa el número de días y la ordenada representa el volumen tumoral. El intervalo de error representa un valor de SE.

[Figura 14] La Figura 14 muestra los efectos antitumorales *in vivo* del conjugado humanizado hG019-fármaco H01L02-DXd o NOV0712-DM4. La evaluación se llevó a cabo usando modelos animales en los cuales se inoculó la línea OVCAR-3 de células tumorales renales humanas positivas para CDH6 en ratones inmunodeficientes. La abscisa representa el número de días y la ordenada representa el volumen tumoral. El intervalo de error representa un valor de SE.

[Figura 15] La Figura 15 muestra los efectos antitumorales *in vivo* del conjugado humanizado hG019-fármaco H01L02-DXd o NOV0712-DM4. La evaluación se llevó a cabo usando modelos animales en los cuales se inoculó la línea 786-O de células tumorales renales humanas positivas para CDH6 en ratones inmunodeficientes. La abscisa representa el número de días y la ordenada representa el volumen tumoral. El intervalo de error representa un valor de SE.

[Figura 16] La Figura 16 muestra los efectos antitumorales *in vivo* del conjugado humanizado hG019-fármaco H01L02-DXd o NOV0712-DM4. La evaluación se llevó a cabo usando modelos animales en los cuales se inoculó la línea ES-2 de células tumorales de ovario humanas negativas para CDH6 en ratones inmunodeficientes. La abscisa representa el número de días y la ordenada representa el volumen tumoral. El intervalo de error representa un valor de SE.

Descripción de realizaciones

En lo sucesivo en el presente documento, las realizaciones preferidas para llevar a cabo la presente invención se describirán con referencia a los dibujos. Debe tenerse en cuenta que las realizaciones descritas a continuación meramente ilustran las realizaciones representativas de la presente invención, y el alcance de la presente invención no debe interpretarse de manera restrictiva debido a estos ejemplos.

En la presente descripción, el término "cáncer" se usa para tener el mismo significado que el del término "tumor".

En la presente descripción, el término "gen" se usa para incluir no solo el ADN sino también su ARNm y ADNc, y el ARNc del mismo.

En la presente descripción, el término "polinucleótido" o "nucleótido" se usa para tener el mismo significado que el de ácido nucleico, y también incluye ADN, ARN, una sonda, un oligonucleótido y un cebador. En la presente descripción, los términos "polinucleótido" y "nucleótido" pueden usarse indistintamente entre sí salvo que se indique lo contrario.

En la presente descripción, los términos "polipéptido" y "proteína" pueden usarse indistintamente entre sí.

En la presente descripción, el término "célula" incluye células en un animal individual y células cultivadas.

- 5 En la presente descripción, el término "CDH6" puede usarse para tener el mismo significado que el de la proteína CDH6. En la presente descripción, el CDH6 humano también se conoce como "hCDH6".

10 En la presente descripción, la expresión "actividad citotóxica" se usa para significar que se provoca un cambio patológico en las células de una manera determinada. La expresión no solo significa un trauma directo, sino que también significa todo tipo de daño estructural o funcional provocado a las células, tal como escisión de ADN, formación de un dímero de bases, escisión cromosómica, daño al aparato mitótico celular y una reducción en las actividades de diversos tipos de enzimas.

15 En la presente descripción, la expresión "ejercer toxicidad en las células" se usa para significar que la toxicidad se exhibe en las células de cualquier forma determinada. La expresión no solo significa un trauma directo, pero también significa todo tipo de influencia estructural, funcional o metabólica provocada a las células, tal como escisión de ADN, formación de un dímero de bases, escisión cromosómica, daño al aparato mitótico celular, una reducción en las actividades de diversos tipos de enzimas y la supresión de los efectos de los factores de crecimiento celular.

20 En la presente descripción, la expresión "fragmento funcional de un anticuerpo", también llamado "fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo", se usa para significar un fragmento parcial del anticuerpo que tiene actividad de unión contra un antígeno, e incluye Fab, F(ab')₂, scFv, un diacuerpo, un anticuerpo lineal y un anticuerpo multiespecífico formado a partir de fragmentos de anticuerpos y similares. Fab', que es un fragmento monovalente de regiones variables de anticuerpos obtenido mediante el tratamiento de F(ab')₂ en condiciones reductoras, también se incluye
25 en el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. Sin embargo, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo no se limita a estas moléculas, siempre que el fragmento de unión a antígeno tenga capacidad de unirse al antígeno. Estos fragmentos de unión a antígeno incluyen no solo aquellos obtenidos al tratar una molécula de longitud completa de una proteína de anticuerpo con una enzima apropiada, sino proteínas producidas en células hospedadoras apropiadas usando un gen de anticuerpo modificado genéticamente.

30 En la presente descripción, el término "epítipo" se usa para significar el péptido parcial o la estructura tridimensional parcial de CDH6, al que se une un anticuerpo anti-CDH6 específico. Un epítipo tal, que es el péptido parcial de CDH6 descrito anteriormente, puede determinarse mediante un método bien conocido por una persona experta en la materia, tal como un inmunoensayo. En primer lugar, se producen diversas estructuras parciales de un antígeno. En lo que se
35 refiere a la producción de dichas estructuras parciales, puede aplicarse una técnica de síntesis de oligopéptidos conocida. Por ejemplo, una serie de polipéptidos, en la cual CDH6 se ha truncado sucesivamente en una longitud apropiada desde el extremo C o el extremo N de los mismos, se producen mediante una técnica de recombinación genética bien conocida por una persona experta en la materia. En lo sucesivo, se estudia la reactividad de un anticuerpo ante dichos polipéptidos y se determinan aproximadamente los sitios de reconocimiento. En lo sucesivo,
40 se sintetizan péptidos adicionales más cortos y a continuación puede estudiarse su reactividad con estos péptidos, de tal manera que se determine un epítipo. Cuando un anticuerpo que se une a una proteína de membrana que tiene una pluralidad de dominios extracelulares se dirige a una estructura tridimensional compuesta por una pluralidad de dominios como un epítipo, el dominio al que se une el anticuerpo puede determinarse modificando la secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular específico y modificando de esta manera la estructura tridimensional. El
45 epítipo, que es una estructura tridimensional parcial de un antígeno que se une a un anticuerpo específico, también puede determinarse especificando los restos de aminoácidos de un antígeno adyacente al anticuerpo mediante análisis estructural de rayos X.

50 En la presente descripción, la expresión "anticuerpos que se unen al mismo epítipo" se usa para significar anticuerpos que se unen a un epítipo común. Si un segundo anticuerpo se une a un péptido parcial o a una estructura tridimensional parcial a la que se une un primer anticuerpo, puede determinarse que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítipo. Como alternativa, al confirmar que un segundo anticuerpo compite con un primer anticuerpo por la unión del primer anticuerpo a un antígeno (es decir, un segundo anticuerpo interfiere con la unión de un primer anticuerpo a un antígeno), puede determinarse que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al
55 mismo epítipo, incluso si no se ha determinado la secuencia o la estructura específicas del epítipo. En la presente descripción, la expresión "unión al mismo epítipo" se refiere al caso en el que se determina que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a un epítipo común mediante uno cualquiera o ambos de estos métodos de determinación. Cuando un primer anticuerpo y un segundo anticuerpo se unen al mismo epítipo y además, el primer anticuerpo tiene efectos especiales como actividad antitumoral o actividad de internalización, puede esperarse que el
60 segundo anticuerpo tenga la misma actividad que la del primer anticuerpo.

65 En la presente descripción, el término "CDR" se usa para significar una región determinante de complementariedad. Se sabe que la cadena pesada y la cadena ligera de una molécula de anticuerpo tienen cada una tres CDR. Esta CDR también se denomina región hipervariable y se encuentra en las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo. Estas regiones tienen una estructura primaria particularmente variable y están separadas en tres sitios en la estructura primaria de la cadena polipeptídica, tanto en la cadena pesada como en la cadena ligera.

En la presente descripción, con respecto a la CDR de un anticuerpo, las CDR de una cadena pesada se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente, desde el lado aminoterminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, mientras que las CDR de una cadena ligera se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente, desde el lado aminoterminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera. Estos sitios están ubicados cerca uno del otro en la estructura tridimensional y determinan la especificidad del anticuerpo hacia un antígeno al cual se une el anticuerpo.

En la presente invención, la expresión "hibridar en condiciones rigurosas" se usa para significar que la hibridación se lleva a cabo en la solución de hibridación disponible en el mercado ExpressHyb Hybridization Solution (fabricada por Clontech Laboratories, Inc.) a 68 °C, o que la hibridación se lleva a cabo en condiciones en las cuales la hibridación se lleva a cabo usando un filtro inmovilizado de ADN en presencia de 0,7 a 1,0 M de NaCl a 68 °C, y el resultado se lava a continuación a 68 °C con una concentración de 0,1 a 2 veces de solución de SSC (en donde la concentración 1 vez de SSC consiste en 150 mM de NaCl y 15 mM de citrato sódico) para identificación o condiciones equivalentes a las mismas.

En la presente descripción, la expresión "uno a varios" se usa para significar 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3 o 1 o 2.

1. CDH6

Las cadherinas son glucoproteínas presentes en la superficie de las membranas celulares y funcionan como moléculas de adhesión célula-célula a través de la unión dependiente de iones de calcio de sus dominios extracelulares N-terminales, o como moléculas de señal responsables de la interacción célula-célula. Las cadherinas clásicas pertenecen a la superfamilia de las cadherinas y son proteínas transmembrana de un solo paso compuestas por cinco dominios extracelulares (dominios EC), una región transmembrana y un dominio intracelular.

La CDH6 (cadherina-6) es una proteína transmembrana de un solo paso compuesta por 790 aminoácidos, que se clasifica en la familia de cadherinas tipo II, y esta proteína tiene dominios extracelulares N-terminales e intracelulares C-terminales. El gen CDH6 humano se clonó por primera vez en 1995 (Bibliografía no de patentes 1) y su secuencia puede consultarse en, por ejemplo, los N.º de registro NM_004932 y NP_004923 (NCBI).

La proteína CDH6 usada en la presente invención puede purificarse directamente a partir de las células que expresan CDH6 de un mamífero humano o no humano (por ejemplo, una rata, un ratón o un mono) y a continuación puede usarse, o puede prepararse una fracción de membrana celular de las células mencionadas anteriormente y puede usarse como la proteína CDH6. Como alternativa, CDH6 también puede obtenerse sintetizándola *in vitro* o permitiendo que las células hospedadoras produzcan CDH6 mediante manipulación genética. De acuerdo con dicha manipulación genética, la proteína CDH6 puede obtenerse, específicamente, incorporando el ADNc de CDH6 a un vector capaz de expresar el ADNc de CDH6 y a continuación sintetizando CDH6 en una solución que contiene enzimas, sustrato y materiales energéticos necesarios para la transcripción y la traducción, o transformando las células hospedadoras de otros procariotas o eucariotas, de tal manera que les permita expresar CDH6. También, pueden usarse células que expresen CDH6 basadas en la manipulación genética descrita anteriormente, o una línea celular que exprese CDH6, para presentar la proteína CDH6. Como alternativa, el vector de expresión en el cual se ha incorporado el ADNc de CDH6 puede administrarse directamente a un animal a inmunizar, y CDH6 puede expresarse en el cuerpo del animal inmunizado de esta manera.

Por otra parte, una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, una eliminación y/o una adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente de CDH6 y tiene una actividad biológica equivalente a la de la proteína CDH6, también se incluye dentro del término "CDH6".

La proteína CDH6 humana tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1. La región extracelular de la proteína CDH6 humana está compuesta por el dominio extracelular 1 (en la presente descripción, también denominado EC1) que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones 54 a 159 en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, el dominio extracelular 2 (en la presente descripción, también denominado EC2) que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones 160 a 268 en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, el dominio extracelular 3 (en la presente descripción, también denominado EC3) que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones 269 a 383 en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, el dominio extracelular 4 (en la presente descripción, también denominado EC4) que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones 384 a 486 en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 y el dominio extracelular 5 (en la presente descripción, también denominado EC5) que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones 487 a 608 en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1. Las secuencias de aminoácidos de EC1 a EC5 se muestran en SEQ ID NO: 2 a 6, respectivamente (Tabla 1).

2. Producción de anticuerpos anti-CDH6

Un ejemplo del anticuerpo anti-CDH6 de la presente invención puede incluir un anticuerpo anti-CDH6 que reconoce

una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 y tiene actividad de internalización. Un ejemplo del anticuerpo anti-CDH6 de la presente invención puede incluir un anticuerpo anti-CDH6 que reconoce específicamente una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 y tiene actividad de internalización. Un ejemplo del anticuerpo anti-CDH6 de la presente invención puede incluir un anticuerpo anti-CDH6 que reconoce una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 y tiene actividad de internalización. Un ejemplo del anticuerpo anti-CDH6 de la presente invención puede incluir un anticuerpo anti-CDH6 que reconoce específicamente una secuencia de aminoácidos que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 y tiene actividad de internalización. La expresión "reconocer específicamente una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4" o "reconocer específicamente un dominio EC3" según se aplica a un anticuerpo se usa para significar que el anticuerpo reconoce fuertemente o se une fuertemente al dominio EC3 de CDH6 en comparación con los otros dominios extracelulares de CDH6.

El anticuerpo anti-CDH6 de la presente invención puede derivar de cualquier especie. Los ejemplos preferidos de especies pueden incluir seres humanos, monos, ratas, ratones y conejos. Cuando el anticuerpo anti-CDH6 de la presente invención deriva de una especie distinta a los seres humanos, se prefiere quimerizar o humanizar el anticuerpo anti-CDH6 mediante una técnica bien conocida. El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o puede ser un anticuerpo monoclonal y se prefiere un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo anti-CDH6 de la presente invención es un anticuerpo que puede dirigirse a las células tumorales. Específicamente, el anticuerpo anti-CDH6 de la presente invención posee la propiedad de poder reconocer células tumorales, la propiedad de poder unirse a células tumorales y/o la propiedad de internalizarse en células tumorales por captación celular, y similares. En consecuencia, el anticuerpo anti-CDH6 de la presente invención puede conjugarse con un compuesto que tiene actividad antitumoral a través de un enlazador para preparar un conjugado de anticuerpo y fármaco.

La actividad de unión de un anticuerpo contra células tumorales puede confirmarse mediante citometría de flujo. La captación de un anticuerpo en las células tumorales puede confirmarse mediante (1) un ensayo de visualización de un anticuerpo captado celularmente bajo un microscopio fluorescente usando un anticuerpo secundario (marcado con fluorescencia) que se une al anticuerpo (Cell Death and Differentiation, 2008, 15, 751-761), (2) un ensayo para medir la cantidad de fluorescencia captada celularmente usando un anticuerpo secundario (marcado con fluorescencia) que se une al anticuerpo (Molecular Biology of the Cell Vol. 15, 5268-5282, diciembre de 2004) o (3) un ensayo Mab-ZAP usando una inmunotoxina que se une al anticuerpo, en donde la toxina se libera tras la absorción celular, con el fin de suprimir el crecimiento celular (Bio Techniques 28: 162-165, enero de 2000). Una proteína conjugada recombinante de una región catalítica de la toxina de la difteria y la proteína G puede usarse como la inmunotoxina.

En la presente descripción, la expresión "alta capacidad de internalización" se usa para significar que la tasa de supervivencia (que se indica mediante una relación relativa a una tasa de supervivencia celular sin adición de anticuerpos definida como el 100 %) de las células que expresan CDH6 a las que se han administrado el anticuerpo mencionado anteriormente y un anticuerpo anti-IgG de rata marcado con saporina es preferentemente del 70 % o menos, y más preferentemente del 60 % o menos.

El conjugado de anticuerpo antitumoral y fármaco de la presente invención comprende un compuesto conjugado que ejerce un efecto antitumoral. Por lo tanto, se prefiere, pero no es esencial, que el propio anticuerpo debería tener un efecto antitumoral. Con el fin de ejercer de forma específica y/o selectiva la citotoxicidad del compuesto antitumoral en células tumorales, es importante y preferible que el anticuerpo tenga la propiedad de ser internalizado y transferido a las células tumorales.

El anticuerpo anti-CDH6 puede obtenerse inmunizando un animal con un polipéptido que sirve como antígeno mediante un método habitualmente realizado en este campo, y a continuación recolectando y purificando un anticuerpo producido en un cuerpo vivo del mismo. Se prefiere usar CDH6 que conserva una estructura tridimensional como un antígeno. Los ejemplos de dicho método pueden incluir un método de inmunización de ADN.

El origen del antígeno no se limita al ser humano y, por lo tanto, un animal también puede inmunizarse con un antígeno derivado de un animal no humano tal como un ratón o una rata. En este caso, puede seleccionarse un anticuerpo aplicable a la enfermedad de un ser humano examinando la reactividad cruzada de la unión del anticuerpo obtenido al antígeno heterólogo con el antígeno humano.

Adicionalmente, las células productoras de anticuerpos que producen un anticuerpo contra el antígeno pueden fusionarse con células de mieloma de acuerdo con un método conocido (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature (1975) 256, 495-497; y Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)) para establecer hibridomas, con el fin de obtener un anticuerpo monoclonal.

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá específicamente el método para obtener un anticuerpo contra CDH6.

(1) Preparación del antígeno

El antígeno puede obtenerse permitiendo que las células hospedadoras produzcan un gen que codifique la proteína antigénica de acuerdo con manipulación genética. Específicamente, se produce un vector capaz de expresar el gen del antígeno y a continuación el vector se introduce en las células hospedadoras, de tal manera que el gen se exprese allí, y posteriormente, el antígeno expresado puede purificarse. El anticuerpo también puede obtenerse mediante un método de inmunización de un animal con células que expresan el antígeno basado en la manipulación genética descrita anteriormente, o una línea celular que expresa el antígeno.

Como alternativa, el anticuerpo también puede obtenerse, sin el uso de la proteína antigénica, mediante la incorporación de ADNc de la proteína antigénica en un vector de expresión, a continuación administrar el vector de expresión a un animal a inmunizar, y expresar la proteína antigénica en el cuerpo del animal inmunizado de esta manera, de tal manera que se produzca en el mismo un anticuerpo contra la proteína antigénica.

(2) Producción de anticuerpo monoclonal anti-CDH6

El anticuerpo anti-CDH6 usado en la presente invención no está particularmente limitado. Por ejemplo, puede usarse adecuadamente un anticuerpo especificado por una secuencia de aminoácidos mostrada en el listado de secuencias de la presente solicitud. El anticuerpo anti-CDH6 usado en la presente invención es deseablemente un anticuerpo que tiene las siguientes propiedades:

(1) un anticuerpo que tiene las siguientes propiedades:

(a) unirse específicamente a CDH6, y

(b) tener la actividad de internalizarse en células que expresan CDH6 mediante la unión a CDH6;

(2) el anticuerpo de acuerdo con el anterior (1), en donde la CDH6 es CDH6 humana; o

(3) el anticuerpo de acuerdo con los anteriores (1) o (2), en donde el anticuerpo reconoce específicamente EC3 de CDH6 humana y tiene actividad de internalización.

El método para obtener el anticuerpo contra CDH6 de la presente invención no está particularmente limitado siempre que pueda obtenerse un anticuerpo anti-CDH6. Se prefiere usar CDH6 conservando su conformación como antígeno.

Un ejemplo preferido del método para obtener el anticuerpo puede incluir un método de inmunización de ADN. El método de inmunización de ADN es un enfoque que implica transfectar un individuo animal (por ejemplo, ratón o rata) con un plásmido de expresión de antígeno y a continuación expresar el antígeno en el individuo para inducir inmunidad contra el antígeno. El enfoque de transfección incluye un método de inyección directa del plásmido en el músculo, un método de inyección de un reactivo de transfección tal como un liposoma o polietilenimina en la vena, un enfoque que usa un vector vírico, un enfoque que consiste en inyectar partículas de oro adheridas al plásmido mediante una pistola genética, un método hidrodinámico para inyectar rápidamente una solución de plásmido en una gran cantidad en la vena, y similares. Con respecto al método de transfección de inyección del plásmido de expresión al músculo, una técnica llamada electroporación *in vivo*, que implica aplicar electroporación en el sitio de inyección intramuscular del plásmido, se conoce como un enfoque para mejorar los niveles de expresión (Aihara H, Miyazaki J. Nat Biotechnol. sep de 1998; 16 (9): 867-70 o Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D. Proc Natl Acad Sci U S A. 13 de abr de 1999; 96 (8): 4262-7). Este enfoque mejora aún más el nivel de expresión al tratar el músculo con hialuronidasa antes de la inyección intramuscular del plásmido (McMahon JM1, Signori E, Wells KE, Fazio VM, Wells DJ., Gene Ther. ago de 2001; 8 (16): 1264-70). Adicionalmente, la producción de hibridomas puede realizarse mediante un método conocido y también puede realizarse usando, por ejemplo, un sistema de producción de hibridomas HybriMune (Cyto Pulse Sciences, Inc.).

Los ejemplos específicos de obtención de un anticuerpo monoclonal pueden incluir los siguientes procedimientos:

(a) la respuesta inmunitaria puede inducirse incorporando ADNc de CDH6 en un vector de expresión (por ejemplo, pcDNA3.1; Thermo Fisher Scientific Inc.), y administrar directamente el vector a un animal (por ejemplo, una rata o un ratón) que se va a inmunizar mediante un método tal como electroporación o una pistola genética, para expresar CDH6 en el cuerpo del animal. La administración del vector por electroporación o similares puede realizarse una o más veces, preferentemente una pluralidad de veces, si es necesario para mejorar el título de anticuerpos;

(b) colección de tejido (por ejemplo, un ganglio linfático) que contiene células productoras de anticuerpos del animal mencionado anteriormente en el que se ha inducido la respuesta inmunitaria;

(c) preparación de células de mieloma (en lo sucesivo en el presente documento, denominadas "mielomas") (por ejemplo, células de mieloma de ratón SP2/0-ag14);

(d) fusión celular entre las células productoras de anticuerpos y los mielomas;

(e) selección de un grupo de hibridomas que produzca un anticuerpo de interés;

(f) división en clones de células individuales (clonación);

(g) opcionalmente, el cultivo de hibridomas para la producción en masa de anticuerpos monoclonales, o la cría de

animales en los cuales se inoculan los hibridomas; y/o

(h) estudio de la actividad fisiológica (actividad de internalización) y especificidad de unión del anticuerpo monoclonal producido de esta manera, o examen de las propiedades del anticuerpo como reactivo de marcaje.

- 5 Los ejemplos del método para medir el título de anticuerpos usado en el presente documento pueden incluir, pero no se limitan a, citometría de flujo y ELISA celular.

Los ejemplos de la cepa de hibridoma establecida de esta manera pueden incluir hibridomas productores de anticuerpos anti-CDH6 rG019, rG055, rG056 y rG061. Debe tenerse en cuenta que, en la presente descripción, un anticuerpo producido por el hibridoma rG019 productor de anticuerpos anti-CDH6 se denomina "anticuerpo rG019" o simplemente "rG019", un anticuerpo producido por el hibridoma rG055 se denomina "anticuerpo rG055" o simplemente "rG055", un anticuerpo producido por el hibridoma rG056 se denomina "anticuerpo rG056" o simplemente "rG056" y un anticuerpo producido por el hibridoma rG061 se denomina "anticuerpo rG061" o simplemente "rG061".

15 La región variable de la cadena ligera del anticuerpo rG019 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo rG019 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 11. La región variable de la cadena ligera del anticuerpo rG019 tiene CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14. La región variable de la cadena pesada del anticuerpo rG019 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo rG019 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 16. La región variable de la cadena pesada del anticuerpo rG019 tiene CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19. La secuencia del anticuerpo rG019 se muestra en la Tabla 1.

La región variable de la cadena ligera del anticuerpo rG055 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 20. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo rG055 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 21. La región variable de la cadena ligera del anticuerpo rG055 tiene CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 24. La región variable de la cadena pesada del anticuerpo rG055 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 25. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo rG055 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 26. La región variable de la cadena pesada del anticuerpo rG055 tiene CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 27, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 28 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 29. La secuencia del anticuerpo rG055 se muestra en la Tabla 1.

La región variable de la cadena ligera del anticuerpo rG056 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 30. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo rG056 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 31. La región variable de la cadena ligera del anticuerpo rG056 tiene CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 32, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 33 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34. La región variable de la cadena pesada del anticuerpo rG056 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 35. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo rG056 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 36. La región variable de la cadena pesada del anticuerpo rG056 tiene CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 37, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 38 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 39. La secuencia del anticuerpo rG056 se muestra en la Tabla 1.

La región variable de la cadena ligera del anticuerpo rG061 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 40. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo rG061 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 41. La región variable de la cadena ligera del anticuerpo rG061 tiene CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 42, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44. La región variable de la cadena pesada del anticuerpo rG061 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 45. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo rG061 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 46. La región variable de la cadena pesada del anticuerpo rG061 tiene CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 47, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 48 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 49. La secuencia del anticuerpo rG061 se muestra en la Tabla 1.

Adicionalmente, en el caso en que las etapas (a) a (h) en el anterior "2. Producción de anticuerpos anti-CDH6" se lleven a cabo nuevamente para obtener de forma independiente un anticuerpo monoclonal por separado y también en el caso en que un anticuerpo monoclonal se obtenga por separado mediante otros métodos, puede obtenerse un anticuerpo que tiene una actividad de internalización equivalente a la del anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056 o el anticuerpo rG061. Un ejemplo de un anticuerpo tal puede incluir un anticuerpo que se une al mismo epítipo al que se une el anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056 o el anticuerpo rG061. Si un anticuerpo monoclonal recién preparado se une a un péptido parcial o a una estructura tridimensional parcial a la que se une el anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056 o el anticuerpo rG061, puede determinarse que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo al que se une el anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056 o el anticuerpo rG061. Por otra parte, al confirmar que el anticuerpo monoclonal compite con el anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056 o el anticuerpo rG061 en la unión del anticuerpo a CDH6 (es decir, el anticuerpo monoclonal interfiere con la unión del anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056 o el anticuerpo rG061 a CDH6), puede determinarse que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo al que se une el anticuerpo anti-CDH6, incluso si no se ha determinado la secuencia o la estructura específicas del epítipo. Cuando se confirma que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo al que se une el anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056 o el anticuerpo rG061, entonces se espera firmemente que el anticuerpo monoclonal tenga capacidad de unión a antígeno, actividad biológica y/o actividad de internalización equivalente a la del anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056 o el anticuerpo rG061.

(3) Otros anticuerpos

El anticuerpo de la presente invención también incluye anticuerpos genéticamente recombinantes que se han modificado artificialmente con el fin de reducir la antigenicidad heterogénea para los seres humanos, tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano, así como el anticuerpo monoclonal descrito anteriormente contra CDH6. Estos anticuerpos pueden producirse por métodos conocidos.

Un ejemplo de anticuerpo quimérico puede incluir anticuerpos en los cuales una región variable y una región constante son heterólogas entre sí, tal como un anticuerpo quimérico formado conjugando la región variable de un anticuerpo derivado de ratón o rata con una región constante derivada de ser humano (véase Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851-6855, (1984)).

Los ejemplos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo anti-CDH6 humano de rata incluyen un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que comprende la región variable de la cadena ligera de cada anticuerpo de rata anti-CDH6 humano descrito en la presente descripción (por ejemplo, el anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056 o el anticuerpo rG061) y una región constante derivada de ser humano, y una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada de la misma y una región constante derivada de ser humano.

Otros ejemplos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo anti-CDH6 humana de rata incluyen un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que tiene una sustitución de uno a varios restos, de 1 a 3 restos, 1 o 2 restos, preferentemente 1 resto, de aminoácidos en la región variable de la cadena ligera de cada anticuerpo de rata anti-CDH6 humana descrito en la presente descripción (por ejemplo, el anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056 o el anticuerpo rG061) con otros restos de aminoácidos, y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una sustitución de uno a varios restos, de 1 a 3 restos, 1 o 2 restos, preferentemente 1 resto, de aminoácidos en la región variable de la cadena pesada del mismo con otros restos de aminoácidos. Este anticuerpo puede tener cualquier región constante derivada de ser humano.

Otros ejemplos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo anti-CDH6 humana de rata incluyen un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que tiene una sustitución de 1 o 2 restos, preferentemente 1 resto, de aminoácidos en cualquier 1 a 3 CDR en la región variable de la cadena ligera de cada anticuerpo de rata anti-CDH6 humana descrito en la presente descripción (por ejemplo, el anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056 o el anticuerpo rG061) con otros restos de aminoácidos, y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una sustitución de 1 o 2 restos, preferentemente 1 resto, de aminoácidos en cualquier 1 a 3 CDR en la región variable de cadena pesada de la misma con otros restos de aminoácidos. Este anticuerpo puede tener cualquier región constante derivada de ser humano.

Los ejemplos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo rG019 incluyen un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10, y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15. Este anticuerpo puede tener cualquier región constante derivada de ser humano.

Otros ejemplos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo rG019 incluyen un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que tiene una sustitución de uno a varios restos, de 1 a 3 restos, 1 o 2 restos, preferentemente 1 resto, de aminoácidos en la región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 con otros restos de aminoácidos y una cadena

pesada que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una sustitución de uno a varios restos, de 1 a 3 restos, 1 o 2 restos, preferentemente 1 resto, de aminoácidos en la región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15 con otros restos de aminoácidos. Este anticuerpo puede tener cualquier región constante derivada de ser humano.

5 Otros ejemplos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo rG019 incluyen un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que tiene una sustitución de 1 o 2 restos (preferentemente 1 resto) de aminoácidos en cualquiera de 1 a 3 CDR en la región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10 con otros restos de aminoácidos y una cadena
10 pesada que comprende una región variable de cadena pesada que tiene una sustitución de 1 o 2 restos (preferentemente 1 resto) de aminoácidos en cualquiera de 1 a 3 CDR en la región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15 con otros restos de aminoácidos. Este anticuerpo puede tener cualquier región constante derivada de ser humano.

15 Otros ejemplos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo rG019 incluyen un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10, y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 58. Este anticuerpo puede tener cualquier región constante derivada de ser humano. La secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 58 es una secuencia con un resto
20 de cisteína sustituido con un resto de prolina en CDRH2 en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15.

Los ejemplos específicos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo rG019 incluyen un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada
25 en SEQ ID NO: 53 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 56. En la presente descripción, este anticuerpo quimérico anti-CDH6 humano se denomina un "anticuerpo quimérico G019", un "anticuerpo chG019" o "chG019". La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera del anticuerpo chG019 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 54 y la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada del anticuerpo chG019
30 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 57.

La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo chG019 es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo rG019 y consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10. La cadena ligera del anticuerpo chG019 tiene CDRL1 que consiste en la
35 secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, que son idénticas a CDRL1, CDRL2 y CDRL3 de la cadena ligera, respectivamente, de rG019. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo chG019 está codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 55.

40 La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo chG019 consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 58. La cadena pesada del anticuerpo chG019 tiene CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ
45 ID NO: 19. La secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 58 es una secuencia con un resto de cisteína sustituido con un resto de prolina en CDRH2 en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15. La CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60 es una secuencia con un resto de cisteína sustituido con un resto de prolina en la CDRH2 de rG019 mostrada en SEQ ID NO: 18. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo chG019 está codificada por la secuencia de nucleótidos
50 mostrada en SEQ ID NO: 59.

La secuencia del anticuerpo chG019 se muestra en la Tabla 1.

55 Los ejemplos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo rG055 anticuerpo de rata anti-CDH6 humana incluyen un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 20, y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 25. Este anticuerpo puede tener cualquier región constante derivada de ser humano.

60 Los ejemplos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo rG056 anticuerpo de rata anti-CDH6 humana incluyen un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 30, y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 35. Este anticuerpo puede tener cualquier región constante derivada de ser humano.

65 Los ejemplos del anticuerpo quimérico derivado del anticuerpo rG061 anticuerpo de rata anti-CDH6 humana incluyen

un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 40, y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 45. Este anticuerpo puede tener cualquier región constante derivada de ser humano.

Los ejemplos del anticuerpo humanizado pueden incluir un anticuerpo formado incorporando únicamente regiones determinantes de complementariedad (CDR) en un anticuerpo derivado de ser humano (véase Nature (1986) 321, p. 522-525), un anticuerpo formado mediante la incorporación de los restos de aminoácidos de algunos marcos, así como secuencias CDR, en un anticuerpo humano de acuerdo con un método de injerto de CDR (Publicación Internacional N.º WO90/07861) y un anticuerpo formado modificando las secuencias de aminoácidos de algunas CDR mientras se mantiene la capacidad de unión a antígeno.

En la presente descripción, el anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056, el anticuerpo rG061 o el anticuerpo chG019 no se limita a un anticuerpo humanizado específico siempre que el anticuerpo humanizado conserve las 6 secuencias CDR exclusivas del anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056, el anticuerpo rG061 o el anticuerpo chG019 y tenga actividad de internalización. Las secuencias de aminoácidos de algunas CDR de este anticuerpo humanizado pueden modificarse aún más siempre que tenga actividad de internalización.

Los ejemplos concretos del anticuerpo humanizado del anticuerpo chG019 pueden incluir cualquier combinación dada de: una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos cualquiera seleccionada del grupo que consiste en (1) la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 63 o 67, (2) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 95 % o más (preferentemente una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % o más con la secuencia de una región marco distinta de cada secuencia CDR) con la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente (1) y (3) una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, una sustitución o una adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente (1); y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos cualquiera seleccionada del grupo que consiste en (4) la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 71, 75 o 79, (5) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 95 % o más (preferentemente una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % o más con la secuencia de una región marco distinta de cada secuencia CDR) con la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente (4) y (6) una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, una sustitución o una adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente (4).

Como alternativa, también puede usarse un anticuerpo que tenga una cadena pesada o una cadena ligera humanizadas y la otra cadena derivada de un anticuerpo de rata o un anticuerpo quimérico. Los ejemplos de un anticuerpo tal pueden incluir cualquier combinación dada de: una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos cualquiera seleccionada del grupo que consiste en (1) la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 63 o 67, (2) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 95 % o más (preferentemente una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % o más con la secuencia de una región marco distinta de cada secuencia CDR) con la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente (1) y (3) una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, una sustitución o una adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente (1); y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos cualquiera seleccionada del grupo que consiste en (4) la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 15, 25, 35, 45 o 58, (5) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 95 % o más (preferentemente una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % o más con la secuencia de una región marco distinta de cada secuencia CDR) con la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente (4) y (6) una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, una sustitución o una adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente (4). Otros ejemplos de un anticuerpo tal pueden incluir cualquier combinación dada de: una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una secuencia de aminoácidos cualquiera seleccionada del grupo que consiste en (1) la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 10, 20, 30 o 40, (2) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 95 % o más (preferentemente una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % o más con la secuencia de una región marco distinta de cada secuencia CDR) con la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente (1) y (3) una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, una sustitución o una adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente (1); y una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una secuencia de aminoácidos cualquiera seleccionada del grupo que consiste en (4) la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 71, 75 o 79, (5) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 95 % o más (preferentemente una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % o más con la secuencia de una región marco distinta de cada secuencia CDR) con la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente (4) y (6) una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, una sustitución o una adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente (4).

La sustitución de aminoácidos en la presente descripción es preferentemente una sustitución de aminoácidos conservativa. La sustitución conservativa de aminoácidos es una sustitución que se produce dentro de un grupo de aminoácidos asociado a determinadas cadenas laterales de aminoácidos. Los grupos de aminoácidos preferidos son los siguientes: grupo ácido = ácido aspártico y ácido glutámico; grupo básico = lisina, arginina e histidina; grupo no polar = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano; y familia polar sin carga = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos preferidos son los siguientes: grupo hidroxil alifático = serina y treonina; grupo que contiene amida = asparagina y glutamina; grupo alifático = alanina, valina, leucina e isoleucina; y grupo aromático = fenilalanina, triptófano y tirosina. Una sustitución de aminoácidos tal se lleva a cabo preferentemente sin perjudicar las propiedades de una sustancia que tiene la secuencia de aminoácidos original.

Los ejemplos del anticuerpo que tiene una combinación preferida de las cadenas ligeras y cadenas pesadas descritas anteriormente incluyen un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 63 (en la presente descripción, también denominada una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera hL02) o una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 67 (en la presente descripción, también denominada una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera hL03), y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 71 (en la presente descripción, también denominada una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada hH01), una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 75 (en la presente descripción, también denominada una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada hH02) o una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 79 (en la presente descripción, también denominada una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada hH04). Los ejemplos preferidos de los mismos incluyen: un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 63 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 71; un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 63 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 75; un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 67 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 71; un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 67 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 75; un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 67 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 79. Los ejemplos más preferidos de los mismos incluyen: un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 63 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 71; un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 63 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 75; un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 63 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 79; y un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 67 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 75.

Otros ejemplos del anticuerpo que tiene una combinación preferida de las cadenas ligeras y cadenas pesadas descritas anteriormente incluyen un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 61 (en la presente descripción, también denominada la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera hL02) o una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 65 (en la presente descripción, también denominada la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera hL03), y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 69 (en la presente descripción, también denominada la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada hH01), una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 73 (en la presente descripción, también denominada la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada hH02) o una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 77 (en la presente descripción, también denominada la secuencia de

aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada hH04). Los ejemplos preferidos de los mismos incluyen: un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 69; un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 73; un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 77; un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 65 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 69; un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 65 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 73; y un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 65 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 77. Los ejemplos más preferidos de los mismos incluyen: un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 69 (en la presente descripción, también denominado el "anticuerpo H01L02" o "H01L02"); un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 73 (en la presente descripción, también denominado el "anticuerpo H02L02" o "H02L02"); un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 77 (en la presente descripción, también denominado el "anticuerpo H04L02" o "H04L02"); y un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 65 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 73 (en la presente descripción, también denominado el "anticuerpo H02L03" o "H02L03"). Las secuencias del anticuerpo H01L02, el anticuerpo H02L02, el anticuerpo H02L03 o el anticuerpo H04L02 se muestran en la Tabla 1.

Al combinar secuencias que muestran una alta identidad con las secuencias de aminoácidos de cadena pesada y de cadena ligera descritas anteriormente, es posible seleccionar un anticuerpo que tenga una actividad biológica equivalente a la de cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente. Una identidad tal es una identidad de generalmente el 80 % o más, preferentemente el 90 % o más, más preferentemente el 95 % o más y lo más preferentemente el 99 % o más. Por otra parte, también mediante la combinación de secuencias de aminoácidos de una cadena pesada y una cadena ligera que comprenden una sustitución, una eliminación o una adición de uno o varios restos de aminoácidos del mismo con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada o una cadena ligera, es posible seleccionar un anticuerpo que tenga una actividad biológica equivalente a la de cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente.

La identidad entre dos tipos de secuencias de aminoácidos puede determinarse alineando las secuencias usando los parámetros predeterminados de Clustal W versión 2 (Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ y Higgins DG (2007), "Clustal W and Clustal X version 2.0", *Bioinformatics*. 23 (21): 2947-2948).

Debe tenerse en cuenta que, en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera hL02 mostrada en SEQ ID NO: 61, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 1 a 20 es la secuencia señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 21 a 128 es la región variable y la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 129 a 233 es la región constante. En la secuencia de nucleótidos de longitud completa de la cadena ligera hL02 mostrada en SEQ ID NO: 62, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 1 a 60 codifica la secuencia señal, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 61 a 384

codifica la región variable y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 385 a 699 codifica la región constante.

En la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera hL03 mostrada en SEQ ID NO: 65, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 1 a 20 es la secuencia señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 21 a 128 es la región variable y la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 129 a 233 es la región constante. En la secuencia de nucleótidos de longitud completa de la cadena ligera hL03 mostrada en SEQ ID NO: 66, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 1 a 60 codifica la secuencia señal, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 61 a 384 codifica la región variable y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 385 a 699 codifica la región constante.

En la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada hH01 mostrada en SEQ ID NO: 69, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 1 a 19 es la secuencia señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 20 a 141 es la región variable y la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 142 a 471 es la región constante. En la secuencia de nucleótidos de longitud completa de la cadena pesada hH01 mostrada en SEQ ID NO: 70, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 1 a 57 codifica la secuencia señal, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 58 a 423 codifica la región variable y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 424 a 1413 codifica la región constante.

En la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada hH02 mostrada en SEQ ID NO: 73, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 1 a 19 es la secuencia señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 20 a 141 es la región variable y la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 142 a 471 es la región constante. En la secuencia de nucleótidos de longitud completa de la cadena pesada hH02 mostrada en SEQ ID NO: 74, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 1 a 57 codifica la secuencia señal, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 58 a 423 codifica la región variable y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 424 a 1413 codifica la región constante.

En la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada hH04 mostrada en SEQ ID NO: 77, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 1 a 19 es la secuencia señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 20 a 141 es la región variable y la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 142 a 471 es la región constante. En la secuencia de nucleótidos de longitud completa de la cadena pesada hH04 mostrada en SEQ ID NO: 78, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 1 a 57 codifica la secuencia señal, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 58 a 423 codifica la región variable y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones 424 a 1413 codifica la región constante.

[Tabla 1-1]

SEQ ID NO		Secuencia
1	Secuencias de aminoácidos del ORF de CDH6 humana	MRTYRYFLLLFWGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAAKKRALELSGNSKNELNRSKRSMW NOFFLLEETGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREKPVYILRAQAINRRRTGRPVPESEFIJKIHDINDNEPIFTKEVYTATVPEM SDVGTFFVQVTATDADPTYGNSAKVVYSILQGOPYFSVESETGIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTNIITLDVNDNPPRFQSTYQFKTPESPPGT PIGRKASDADVGENAEIYSITDGEGLDMFDVITDQETQEGITVKKLLDFEKKV YTLKVEASNYPVEPRFLYLGPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQIN TTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLWHNI TVIATEINNPKQSSRPVLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKAQDLITLHAYD KDDPYSGHQFSFLAPEAASGSNFTIQDNKONTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVV SDNDYPVQSSGTGTVTRVCACDHHGMMQSCHAELIHPTGLSTGALVAILLCIVILL VTVVLFAALRRORKKEPLIISKEDIRDNIYSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLRNPETIE DNKLRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINORLKENDTDPAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDADQDYDLSDWGPRFKKLADMYGGVDSDDKDS
2	EC1 de CDH6 humana	SMMNNOFFLLEETGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDI QATKRLDREKPVYILRAQAINRRRTGRPVPESEFIJKIHDINDNEPIF
3	EC2 de CDH6 humana	TKEVYTATVPEMSDVGTFFVQVTATDADPTYGNSAKVVYSILQGOPYFSVESETGI IKTALLNMDRENREQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTNIITLDVNDNPPRF

(continuación)

SEQ ID NO		Secuencia
4	EC3 de CDH6 humana	PQSTYQFKTPESPPTGPIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETQ EGIIITVKKLLDFEKKKVYTLKVEASNPYVEPRFLYLGPFKDSATVRIVVEDVDEPPV F
5	EC4 de CDH6 humana	SKLAYILQIREDAQINTTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSI FTSKLLDRETLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAP
6	EC5 de CDH6 humana	EFAEFYETVCEKAKAQDLIQTLHAVDKDDPYSGHQFSFLAPEAASGSNFTIQDNK DNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVISDNDYPVQSSGTGTVTVRVACDHHGMMQSC HAEALHP
7	Secuencia de aminoácidos del ORF de CDH6 de ratón	MRTYRYFLLLFVWGQPYPTFSNPLSKRTSGFPAKRKALELSANSRNELSRKRSWMW NQFFLLEEYTGSDYQYVVKLHSDQDRGDSGLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREKPVYILRAQAINRRTGRPEPESEFIKIHNDINNEPIFTKDVYTATVP ADVGTFFVQVTATDADDPYGNSAKVVSILQGGPYFSVESETGIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTNIITLTDVNDNPPRFQSTYQFKTPESPPTG PIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETQEGIIITVKKLLDFEKKV YTLKVEASNPVPRFLYLGPFKDSATVRIVVDDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQIN TTIGSVAAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLWHN ITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETVCEKAKAQDLIQTLRAVD KDDPYSGHQFSFLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVV ISDNDYPVQSSGTGTVTVRVACDHHGMMQSCHAELIHPTGLSTGALVAIILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDITGLRNPEAME DSKSRDIVEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDPAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDGDQDYDYLSDWGPFRFKKLADMYGGMDSKDS

[Tabla 1-2]

8	Secuencias de aminoácidos del ORF de CDH6 de rata	MRTYRYFLLLFVWGQPYPTFSNPLSKRTSGFPAKRRALELSANSRNELSRKRSWMW NQFFLLEEYTGSDYQYVVKLHSDQDRGDSGLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREKPVYILRAQAINRRTGRPEPESEFIKIHNDINNEPIFTKDVYTATVP ADVGTFFVQVTATDADDPYGNSAKVVSILQGGPYFSVESETGIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTNIITLTDVNDNPPRFQSTYQFKTPESPPTG PIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETQEGIIITVKKLLDFEKKV YTLKVEASNPVPRFLYLGPFKDSATVRIVVDDVDEPPVFSKPAYILQIREDAQIN TTIGSVAAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLWHN ITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETVCEKAKAQDLIQTLHAVD KDDPYSGHQFSFLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVV ISDNDYPVQSSGTGTVTVRVACDHHGMMQSCHAELIHPTGLSTGALVAIILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDITGLRNPKPW QQSRDMVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFISQRLKMNTPAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDGDQDYDYLSDWGPFRFKKLADMYGGMDSKDS
9	Secuencia de aminoácidos del ORF de CDH6 de macaco cangrejero	MRTYRYFLLLFVWGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKRKALELSGNSKNELNRSKRSMW NQFFLLEEYTGSDYQYVVKLHSDQDRGDSGLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATK RLDREKPVYILRAQAINRRTGRPEPESEFIKIHNDINNEPIFTKEVYTATVP SDVGTFFVQVTATDADDPYGNSAKVVSILQGGPYFSVESETGIKTALLNMDREN REQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTNIITLTDVNDNPPRFQSTYQFKTPESPPTG PIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETQEGIIITVKKLLDFEKKV YTLKVEASNPVPRFLYLGPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQIN TTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLWHN ITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETVCEKAKAQDLIQTLRAVD KDDPYSGHQFSFLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVV ISDNDYPVQSSGTGTVTVRVACDHHGMMQSCHAELIHPTGLSTGALVAIILLCIVILL VTVVLFAALRRQRKKEPLISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDITGLRNPEAIE DNKLRRDIVEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLKENDTDPAPPYDSLATYAYE GTGSVADSLSSLESVTTDGDQDYDYLSDWGPFRFKKLADMYGGVDSKDS
10	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de rG019	DIQNTQSPSLLSASVGDVRLNCKASQNIYKNLAWYQKLGEGFKLLIYDANTLOTG IPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDVATYFCQQYSSGWAFFGGVTNLELKR

(continuación)

11	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de rG019	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCACTCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTC ACTCTCAACTGCAAAAGCAAGTCAGAATATTTATAAGAACTTAGCCTGGTATCAGCAA AAGCTTGGAGAAGGTCCCAAACCTCTGATTTATGATGCAAACTTTGCAAAACGGGC ATCCCATCAAGGTTGAGTGGCAGTGGATCTGGTTCAGATTTACACTCACCATCAGC AGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCCACATATTTCTGCCAGCAGTACTATAGCGGGTGG GCGTTGGTGGAGTCACCAACCTGGAATTGAAACGGGCT
12	CDRL1 de rG019	KASQNIYKNLA
13	CDRL2 de rG019	DANTLQT
14	CDRL3 de rG019	QYYSGWA

[Tabla 1-3]

15	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de rG019	QVQLQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFRNFMHWIKQDPGNLEWIGWIYCGDGE TEYNOKFNGKATLTADRSSTAYMELSRITSEDSAVYFCARGVYGGFAGGYDFWGG GVMVTYSS
16	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de rG019	CAGGTACAGCTGCAGCAATCTGGGGCTGAAGTGGTGAAGCCTGGGCTCAGTGAAA ATTTCTGCAAGGCTCTGGCTACAGCTTACCAGGAACCTTTATGCACTGGATAAAA CAGCAGCCTGGAAATGGCCTTGAGTGGATTGGTGGATTATTGTGGAGATGGTGAG ACAGAGTACAATCAAAAGTTCAATGGGAAGGCAACACTCACTGCGGACAGATCCTCC AGCACAGCGTATATGGAGCTCAGCAGACTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTG TGTGCAAGAGGGGTTTACGGAGGGTTTGGCGGGGCTACTTTGATTCTGGGGCCAA GGAGTCATGGTCAGTCTCCTCA
17	CDRH1 de rG019	GYTFRNFMH
18	CDRH2 de rG019	WIYCGDGETE
19	CDRH3 de rG019	GVYGGFAGGYFDF
20	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de rG055	DVQMTSPSYLAASPGESVSI SCKTSKNISNYLVWYQQKPGAEYKLLIYSGSTLQSG TPSRFSGSGSDFTLTIRSLPEDFGLYFCQYYEKPFYFGSGTKLEIKRA
21	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de rG055	GATGTCGAGATGACCCACTCTCGCTTATCTTGTCTGCGTCTCCTGGAGAAAGTGT TCCATCAGTTGCAAGACAAGTAAGAACATTAGTAATTATTTAGTCTGGTATCAACAG AAACCTGGGGAAGCATATAAGCTTCTTATCTATTCTGGGTCAACTTTGCAATCTGGA ACTCCATCAAGGTTGAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACTATCAGA AGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGGACTCTATTCTGTCAACAGTATTATGAAAACCA TTCAGTTGGCTCAGGGACGAAGTTGGAATAAAACGGGCT
22	CDRL1 de rG055	KTSKNISNYLV
23	CDRL2 de rG055	SGSTLQS
24	CDRL3 de rG055	QYYEKPFT
25	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de rG055	EVQLQESGPGLVPRPSQSLSLSCSVTDYSITSNYWGWIRRFPGNKMEWMGYITYSGYT SYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTAEDTATYYCARSJNHGGYSYVVDWGP ASVTYSS
26	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de rG055	GAGGTGCAACTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTGAGACCTCAGTCACTCTCC CTCTCCTGTTCTGTCACTGATTACTCCATCACTAGTAATTACTGGGGCTGGATCCGG AGGTTCCAGGAAATAAAATGGAGTGGATGGGATACATAACCTATAGTGGTTACACT AGCTACAACCCATCTCTCCAAAGTCGAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAAT CAGTTCTTCTGCAAGTTGAACTCTGTAAGTCTGAGGACACAGCCACATATTACTGT GCAAGATCGATTAAACACGGAGGATATAGTTATGTTGTGGATGCTGGGGTCCGGGA GCTTCAGTCACTGTCTCCTCA
27	CDRH1 de rG055	DYSITSNYWG
28	CDRH2 de rG055	YITYSGYTS
29	CDRH3 de rG055	SINHHGYSYVVD

[Tabla 1-4]

30	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de rG056	DVQMTQSPSSLAASPGESVSI SCRATKSI GIYLAWYQOKPGKTFKLLI YSGSTLQSG TPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLPEDFGLYFCQQFYENPFI FGSGETKLEIRRA
31	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de rG056	GATGTCCAGATGACCCAGTCTCGGTCTTCTCTTGGTCTCCTGGAGAAAGTGT TCCATCAGTTGCAGGGCAACTAAGAGCATTGGTATTATTTAGCCTGGTATCAACAG AAACCTGGGAAAACATTTAAGCTTCTTATCTACTCTGGGTCACTTTGCAATCTGGA ACTCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGA AGCCTGGAGCCTGAAGATTTGGACTCTATTCTGTCAACAGTTTATGAAAACCCA TTCAGTTCTGGCTCAGGGACGAAGTTGGAATAAGACGGGCT
32	CDRL1 de rG056	RATKSI GIYLA
33	CDRL2 de rG056	SGSTLQS
34	CDRL3 de rG056	QQFYENPFT
35	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de rG056	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVT DYSITTYFWGIRKFPGNKMEWMGYMSYRGST SYNP SLKSRISITRDT SKNQFFLQLNSVT TTDATYYCARCPNYGGHSLVFDYWGQG VMVTVSS
36	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de rG056	GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTAACCCCTCACAGTCACTCTCC CTCACCTGTTCTGTCACTGATTACTCCATCACTACTTATTTCTGGGGCTGGATCCGG AAGTTCCAGGAAATAAATGGAGTGGATGGGATACATGAGTACCGTGGTGGCACT TCCTACAACCCATCTCTCAAGAGTCGAATCTCCATTACTAGAGACACATCGAAGAAT CAGTTCTTCTGCAGTTGAACCTGTAACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGT GCAAGATGCCCTAAGTACGGAGGGCATTCCCTGTTTTGATTACTGGGGCCAAAGGA GTCATGGTCACAGTGTCTCA
37	CDRH1 de rG056	DYSITTYFWG
38	CDRH2 de rG056	YMSYRGGST
39	CDRH3 de rG056	CPNYGGHSLVFDY
40	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de rG061	DVQMTQSPSYLAASPGESVSI SCKATKSI SNYLAWYQOKPGEAYKVL IYSGSTLQSG TPSRFSGSGSGTDFTLTIRSLPEDFGLYSCQQYIEKPLTFGSGETKLEIKRA
41	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de rG061	GATGTCCAGATGACCCAGTCTCGGTCTTATCTTGGTCTCCTGGAGAAAGTGT TCCATCAGTTGCAAGGCAACTAAGAGCATTAGTAATTATTTAGCCTGGTATCAACAG AAACCTGGGGAAGCATATAAGGTTCTTATCTATCTGGGTCACTTTGCAATCTGGA ACTCCATCAAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGA AGCCTGGAGCCTGAAGATTTGGACTCTATTCTGTCAACAGTATTATGAAAACCG CTCACGTTCTGGTCTGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGGGCT
42	CDRL1 de rG061	KATKSI SNYLA
43	CDRL2 de rG061	SGSTLQS
44	CDRL3 de rG061	QYYEKPLT

[Tabla 1-5]

45	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de rG061	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITTYWGWIRKFPGNKMEWMGYISYSGRT SYNP SLKSRMSITRDASKNQFFLQLNSVT TDDATYYCARSPINHGGYWFDFWGP TMVTVSS
46	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de rG061	GAGGTGCAGTTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTTGTAACCCCTCACAGTCACTCTCC CTCACCTGTTCTGTCACTGGTTACTCCATCACTACTTATTACTGGGGCTGGATCCGG AAGTTCCAGGAAATAAATGGAGTGGATGGGTACATAAGCTACAGTGGTGGCACT AGTTATAAGCCATCTCTCAAAAGTCGAATGTCCATTACTAGAGACGCATCGAAGAAT CAGTTCTTCTACAGTTGAACCTGTAACTACTGACGACACAGCCACATATTACTGT GCAAGATCCGCAATTAACACGGAGGGTACTGGTACTTTGACTTCTGGGGCCAGGA ACCATGGTCACCGTGTCTCA
47	CDRH1 de rG061	GYSITTYWGW
48	CDRH2 de rG061	YISYSGRTS

(continuación)

49	CDRH3 de rG061	SPINHGGYWFDF
50	Fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal de la cadena ligera humana y la región constante de la cadena κ humana	gootccggactctagagccaccATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTGATGTCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGGTACGGCGATATCGTGATGATTAACGTACGGTGGCCGC CCCTCCGTGTTTATCTTCCCTCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCGGGACCGCCCTC CGTGGTGTGCTGCTGAATAAATTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGAGTGAAGGT GGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAATCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAA GGACAGCAGCTAGGCTGAGGAGGAGCGCTGACCGTGAGCAAGCGGAGTACGAGAA GCACAAGGTGACGCTGCGAGGTGACCCACGAGGCGCTGAGCTCCCGGTCACCAA GAGCTTCAACAGGGGGAGTGTtaggggccggtttaaacggggagagcta

[Tabla 1-6]

51	Fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica la secuencia señal de la cadena pesada humana y la región constante de IgG1 humana	gcctccggactctagagccaccATGAAACACCTGTGGTCTTCTCTCTGCTGGTGGC AGCTCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGTGCAATTGTGCAGGCGGTAGCTCAGGCTCC ACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCTGGCAGCCTCCTCCAAGAGCAGCTGTGGCGGC ACAGCGCCCTGGGCTGCTGTGTCAGGACTACTTCCCGAAGCCGTGACCGTGAGC TGAAGTCAAGCGCCCTGACCAAGCGGCTGCACACCTTCCCGCTGCTGCTGAGTCC TCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTGGCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGAGCTACATCTGCAAGGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGA GTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCAGACATGCCACCGCTGCCAGCAGCTGAA CTCTGGGGGGACCTCAGTCTTCTCTTCCCGCCAAAGCCCAAGGACAGCGTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGCCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTACGCTCCTCAGCGTCTG CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACGACAG GTGTACAGCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCGTGACC TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGC CAGCCCGAGAAACAACACAAGAACCCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTC TTCCTCTACAGCAAGCTCAGCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCCTC TCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCGTCTCC CTGTCTCCCGGCAATgagatatcgggcccggtttaaacggggagagcta
52	Fragmento de ADN que comprende la secuencia de ADN que codifica la cadena ligera de chG019	ccagcctccggactctagagccaccATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTGATCAGCCT GCTGCTGTGGATCAGCGCGCGCTACGGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCT GCTGAGCGCCAGCGTGGCGGATAGAGTGACCCGTAAGTGAAGGCCAGCCAGAACAT CTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAAGCTGGGCGAGGGCCCAAGCTGCTGAT CTAGAGGCCAACCCCTGCAGACCGGCATCCCGAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCAG CGGCTCCGACTTCACCTGACAATCAGCAGCCTGCAGCCGAGGACGTGGCCACCTA CTTTTGCCAGCAGTACTACAGCGGCTGGGCTTGGCGGCGTGACCAACCTGGAAGT GAAGAGAGCCGTGGCGCTCCCTCGTGTTCATCTTCCACCTAGCGACGAGCAGCT GAAGTCCGGCAGCAGCTCTGCTGTGTGCTGCTGAACAAGTTCTACCCCGCGAGGC CAAGGTGCAGTGAAGGTGACAAATGCCCTGCAGTCTGGCAACAGCCAGGAAAGCGT GACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCAGCCGTGACCGTGAG CAAGGCCGACTACGAGAAGCAAGGTGTACGCTGCGAAGTGACCCACGAGGCGCT GTCTAGCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGTtaggtttaaacggggag agctaact
53	Secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera de chG019	MVLQTVFISLLWISGAYGDIQMTQSPSLLSASVGDRTVLNCKASQNIYKNLAWYQ QKLGEGLKLLIYDANTLQGTIPSRFSGSGSGSDFTLTISLQPEDVATYFCQQYYSG WAFGGVNLLELKRVAAPSVFIIPPSDEQLKSGTASVVLNLFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

[Tabla 1-7]

54	Secuencia de nucleótidos de longitud completa de la cadena ligera de chG019	ATGGTGGTGCAGACCCAGGTGTTTCATCAGCCTGCTGCTGTGGATCAGCGGCGCCTAC GGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCTGCTGAGCGCCAGCGTGGCGGATAGA GTGACCCCTGAAGTGAAGGCCAGCCAGAATCTACAAGAACCCTGGCCTGGTATCAG CAGAAGGTGGGGGAGGGGCCCAAGCTGCTGATCTACGAGGCCAACACCGCTGCAGACC GGCATCCCGAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCGAGCGCTCCGACTTCACCGTGACAATC AGCAGCCTGCAGCCCGAGGACGTGGCCACCTACTTTTGGCAGCAGTACTACAGCGGC TGGGCTTCGGCGGGGTGACCAACCTGGAAGTGAAGAGAGCCGTGGCGGCTCCCTCC GTGTTTCATCTCCGACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCCGCGACAGCGCTCTGCTGGT TGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAAT GCCCTGCAGTCTGGCAACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCC ACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAG GTGTACGCGCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCGCTGTCTAGCCCGGTGACCAAGAGCTTC AACCGGGGGGAGTGT
10	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de chG019	DIQMTQSPFLLSASVGDVRLNCKASQNIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLQGT IPSRFSGSGSGDFTLTISSLQPEDVATYFCQQYYSWAFGGVTNLELKRA
55	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de chG019	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCCTGCTGAGCGCCAGCGTGGCGGATAGAGTG ACCGTGAAGTGAAGGCCAGCCAGAATCTACAAGAACCCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCTGGGGGAGGGGCCCAAGCTGCTGATCTACGAGGCCAACACCGCTGCAGAGCGGC ATCCCGAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCGAGCGCTCCGACTTCACCGTGACAATCAGC AGCCTGCAGCCCGAGGACGTGGCCACCTACTTTTGGCAGCAGTACTACAGCGGCTGG GCCTTCGGGGGGGTGACCAACCTGGAAGTGAAGAGAGCC
12	CDRL1 de chG019	KASQNIYKNLA
13	CDRL2 de chG019	DANTLQT
14	CDRL3 de chG019	QQYYSGWA
56	Secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada de chG019	MKHLWFFLLVAAPRWVLQVQLQSGAELVKPSSVKISCKASGYTFTRNFMHWIK QQPGNGLEWIGWIYPGDGETEYNQKFNKATLTADRSSSTAYMELSRLTSEDSAVYF CARGVYGGFAGGYFDPMGQGVMTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYITCNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

[Tabla 1-8]

57	Secuencia de nucleótidos de longitud completa de la cadena pesada de chG019	ATGAAACACCTGTGGTCTTCTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGC CAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCGCGGAGCTCGTGAAGCTGGCAGCAGCGTGAAG ATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACAGCTTCACCGGAACCTTCATGCACTGGATCAAG CAGCAGCCCGGCAACGGCTGGAAATGGATCGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACCAGAAATTCAACGGCAAGGCCACCGTGACCGCGCAGAGAAGCAGC TCCACCGCTACATGGAATGAGCCGCTGACGAGCGAGGACAGCGCGGTGTACTTT TGGCGCAGAGCGGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAG GGCGTGATGGTCAACCGTCAGCTCAGGCTCCAGCAAGGGCCCAAGCGTCTCCCGCTG GCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCGTGGGCTGCCGTGGTCAAG GACTACTTCGCGGAACCGGTGACCGTGAGCTGGAAGTCAAGCGCGCTGAGCAGCGCG GTGCACACCTTCCCGCTGTCTGCTGAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGGCTCCAGCAGCTTGGGCAACCGAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCT CAGCAGTGCACACCTGCGCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAAGTCTTCTCTC TTCCCGCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCGCTGAGGTCAATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCAGCAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAG GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGGGTGGTCAAGCGTCTCAGCGTCTGACGACAGGACTGGGTGAATGGCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCGCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCGGGGAACACAGGTGTACAGCCTGCGCCCATGCCGGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGGCTGCAAGGCTTCTATCCGAGC GAGATCGCGCTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCCAC CCTCCGCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCAGCGTGGAG AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGCTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCTGTCTCCCGGCAAA
----	---	---

(continuación)

58	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de chG019	QVQLQQSGAELVKPGSSVKISCKASGYTFRNFMHWIKQQPGNGLEWIGWIYPGDGE TEYNQKFNKGATLTADRSSSTAYMELSRLTSEDSAVYFCARGVYGGFAGGYDFWGG GVMVITYSS
59	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de chG019	CAGGTGCAGGTGCAGCAGTCTGGGCCGAGCTCGTGAAGCCTGGCAGCAGCGTGAAG ATCAGCTGCAAGGCCAGCGCTACACCTTCACCCGGAACCTTCATGCACTGGATCAAG CAGCAGCCCGGCAACGGCTGGAAATGGATCGGCTGGATCTATCCCGCCGACGGCGAG ACAGAGTACAACCAGAAGTTCAACGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAGAAGCAGC TCCACCGCTACATGGAAGTGAAGCGGCTGACCGAGCAGGACAGCGCGGTGTACTTT TGGCCAGAGGCGGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTTGGGCCAG GGCGTATGGTCACCGTCAGTCA
17	CDRH1 de chG019	GYTFRNFMH
60	CDRH2 de chG019	WIYPGDGETE
19	CDRH3 de chG019	GVYGGFAGGYFDF

[Tabla 1-9]

61	Secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera de hL02	MVLQTVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNIYKNLAWYQ QKPGKAPKLLIYDANTLQTGVPSPRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYFCQYYSG WAFGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
62	Secuencia de nucleótidos de longitud completa de la cadena ligera de hL02	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGGATCTCCGGCGCGTAC GGCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGCGACAGAG GTGACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAG CAGAAGCCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACCCCTGCAGACC GGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGAGCGGCTCCGACTTCACCGTGAGAAATC AGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTTTTGCAGCAGTACTACAGCGGC TGGGCTTCCGGCAGGGCAGCAAGGTGGAATCAAGCGTACGGTGGCCGCCCTCC GTGTTTCATCTTCCCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCAGCGCTCCGTGGTG TGCCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGAACA GCCCTGCAGTCCGGGAACCTCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTGAGCAGCAGCCCTGACCCCTGAGCAAGCCGACTACGAGAAGCACAAG GTGTACGCTGCGAGGTGACCCAGCAGGCGCTGAGCTCCCCGTCACCAAGAGCTTC AACAGGGGGAGTGT
63	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de hL02	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNIYKNLAWYQKPGKAPKLLIYDANTLQTG VPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYFCQYYSGWAFGGTKVEIKRT
64	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de hL02	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGCGACAGAGTG ACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAACATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCCGGCAAGGCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACCCCTGCAGACCGGCG GTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGAGCGGCTCCGACTTCACCCTGACAATCAGC AGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTTTTGCAGCAGTACTACAGCGCTGG GCCTTCCGCCAGGGCAGCAAGGTGGAATCAAGCGTACG
65	Secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera de hL03	MVLQTVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQNIYKNLAWYQ QKLGEQPKLLIYDANTLQTGVPSPRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYFCQYYSG WAFGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

[Tabla 1-10]

66	Secuencia de nucleótidos de longitud completa de la cadena ligera de hL03	ATGGTGTGACAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGGTAC GGGACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCTGAGCCGAGCGTGGGCGAGAGA GTGACCATCAGATGCAAGGCCAGCCAGAATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAG CAGAACTGGGCGAGGGGCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCGTGCAGAC GGCGTCCGACAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCGTGACAATC AGCAGCCTGCAGCCGAGGACTTGGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCGGC TGGGCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACGGTGGCGCGCCCTCC GTGTTTCATCTTCCCGCCCTCCGACGAGGAGGTGAAGTCCGGCACCGGCTCCGTGGTG TGCCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGGCCAAGTGCAGTGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGTCCGGGAACCTCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCTGAGCAAGCCGACTACGAGAAGCACAAG GTGTACGCTGCGAGGTGACCCAGCAGGGCTGAGCTCCCGGTCACCAAGAGCTTC AACAGGGGGAGTGT
67	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de hL03	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASCNIIYKNLAWYQQKLGEGPKLLIYDANTLOTG VPSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYYSQWAFGGGTKEIKRT
68	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera de hL03	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTG ACCATCACATGCAAGGCCAGCCAGAATCTACAAGAACCTGGCCTGGTATCAGCAG AAGCTGGGCGAGGGGCCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCAACACCGTGCAGACCGGC GTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCGTGACAATCAGC AGCCTGCAGCCGAGGACTTCCGCACCTACTACTGCCAGCAGTACTACAGCGGCTGG GCCTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACG
69	Secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada de hH01	MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVR QAPQGLEWMGWIIYPGDGETEYAKFGGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY CARGVYGGFAGGYDFWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVEPKSCDKHTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTFEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK

[Tabla 1-11]

70	Secuencia de nucleótidos de longitud completa de la cadena pesada de hH01	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCTCCTGCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGC GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACAGGCGCCAGCGTGAAG GTGCTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCCGGAACCTTCATGCAGTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGGCAGCGCGAG ACAGAGTAGGCCAGAAATCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACCGACACC TCCACCGCTTACATGGAACGTGAGCAGCCTGCCGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGCGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCGCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCGCCCTGGGCTGGCTGGTCAAG GACTACTTCCCGAAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACCTCAGCGCCGTGACGACCGGC GTGCACACCTTCCCGCTGTCTGCGAGTCTCAGGACTCTACTCCGTGAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAAC CAGACATGCCACCCCTGCCAGCAGCTGAAGTCTGCGGGGAGCCCTCAGTCTTCTCTC TTCCCCCAAACCAAGGACACCGTCAATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGACATGC TTGGTGGTGCAGGTGAGCCAGCAAGACCGTGAAGTCAAGTTCAGTGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGC TACCGGCTGGTCAAGCTCCTCAGCGTCTGACCCAGGACTGGCTGAATGCCAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAAGCAAGCCCTCCAGCCGCTATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCGGGAAGCACAGGTGTACACCTGCCCGCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACAGGTGAGCGTGAAGTGGCTGGTCAAAGGGTTGTATCCGAGC GACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGAGAACACTACAAGACCACC CCTCCCGTGTGAGTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAGCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAGAGCGCTCCTGCTGTCTCCCGGCAAA
71	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de hH01	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVRQAPQGLEWMGWIIYPGDGE TEYAKFGGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGVYGGFAGGYDFWGG GTLTVSS

(continuación)

72	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de hH01	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCGGAACCTTCATGCAGTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACGCCCAGAAATCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACACAGCACC TCCACCGCTACATGGAATGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGACACCGCGGTGTACTAT TGTGCCAGAGCGGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCA
----	--	---

[Tabla 1-12]

73	Secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada de hH02	MKHLWFFLLLVAPRWVLSEVLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRNFMHWVR QAPGGLEWMGWYIPGDGETEYNQKFQGRVTITADRSTSTAYMELSSLRSEDYAVYF CARGVYGGFAGGYDFWGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEKSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNKGE YKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
74	Secuencia de nucleótidos de longitud completa de la cadena pesada de hH02	ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGC GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCGGAACCTTCATGCAGTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACAGAAATCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAGAAAGCACC AGCACCAGCTACATGGAATGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGATACCGCGGTGTACTTC TGTGCCAGAGCGGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCAGCCTCCAGCAAGGGCCCAAGCGTCTTCGCGCTG GCACCCTCCTCCAAGAGCAGCTCTGGCGGCACAGCCGCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCGGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTGCGAGTCTCAGGACTCTACTCCTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTGGGCAACCCAGACCTACATGTGCAACGTGAATCAC AAGGCCAGCAACCAAGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCT CAGACATGCCCCACCTGCCCCAGCAGCTGAACCTCTGGGGGGACCCCTCAGTCTTCCTC TTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGAGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGC TACCGGTGGTGCAGGTCTCACCCTGCTGCACAGGACTGGGTGAATGAAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACAGGTGACCGTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTATCCGAGC GACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGCCAGCCGAGAGCAACTACAAGACCACC CCTCCGCTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTACAGCAAGCTCACCCTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAAGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACCCAGAAGAGGCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA
75	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de hH02	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRNFMHWVRQAPGGLEWMGWYIPGDGE TEYNQKFQGRVTITADRSTSTAYMELSSLRSEDYAVYFCARGVYGGFAGGYDFWGG GTLVTSS

5

[Tabla 1-13]

76	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de hH02	GAAGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAG GTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCGGAACCTTCATGCAGTGGGTGCGC CAGGCTCCAGGCCAGGACTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCGACGGCGAG ACAGAGTACAACAGAAATCCAGGGCAGAGTGACCATCACCGCCGACAGAAAGCACC AGCACCAGCTACATGGAATGAGCAGCCTGCGGAGCGAGGATACCGCGGTGTACTTC TGTGCCAGAGCGGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAG GGCACCCTCGTGACCGTCAGCTCA
----	--	---

(continuación)

77	Secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada de hH04	MKHLWFFLLVLAAPRWVLSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWIR QAPGGGLEWMGW1YPGDGETEYAKFQGRVLTADRSTSTAYMELSSLRSEDVAVYY CARGVYGGFAGGYDFWGGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTYSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNKKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DJAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSYMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
78	Secuencia de nucleótidos de longitud completa de la cadena pesada de hH04	ATGAACACCTGTGGTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGC CAGGTGCAGCTGGTGCAGCTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCCAGCGTGAAG GTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCGGAACCTTCATGCACTGGATCCGG CAGGCCCTGGACAGGCCCTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCAGCGCGAG ACAGAGTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCGTGACCGCCAGACAGAACCC AGCACCGCTACATGGAACAGCAGCGCTGGGAGCGAGGACACCGCGCTGACTAT TGTGCCAGAGGGGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAG GGCACCTCTGTACCGTCAAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCGCTG GCACCTCTCCTCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCGCGCTGGGCTGGTGGTCAAG GACTACTTCCCGAACCCTGACCGTGAGCTGGAACCTCAGCGCGCTGACCGCGCGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTGCACTGCTCAGGAGTCTACTCCGTCAGCAGCGTG GTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAC AAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAGAGAGTTGAGCCCAATCTGTGACAAAACCT CACACATGCCACCTTGGCCAGCAGCTGAACCTCTGGGGGACCGCTCAGTCTTCTC TTCCCGCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCGCTGAGGTGACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACACAGCAGC TACCGGGTGGTCAAGCTCTCACCCTCTGCAACAGGAGTGGCTGAATGGCAGGAG TACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCGCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGCCAGCCCGGGGAACACAGGTGTACACCTGCCCGCATCCCGGGAG GAGATGACCAAGAACAGGTGACGCTGACCTGCTCAAGGCTTCTATCCGAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCGAGAACAACTACAGAGCACCC CCTCCGCTGCTGAGCTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCAGCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTG CACAACTACACCCAGAGAGCTCTCCTGTCTCCCGGCAAA

[Tabla 1-14]

79	Secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada de hH04	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWIRQAPGGGLEWMGW1YPGDGE TEYAKFQGRVLTADRSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVYGGFAGGYDFWGG GTLVTVSS
80	Secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada de hH04	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCAGGCCAGCGTGAAG GTGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTTACCGGAACCTTCATGCACTGGATCCGG CAGGCCCTGGACAGGCCCTGGAATGGATGGGCTGGATCTATCCCGGCAGCGCGAG ACAGAGTACGCCCAGAAATTCCAGGGCAGAGTGACCGTGACCGCCAGACAGAACCC AGCACCGCTACATGGAACAGCAGCGCTGGGAGCGAGGACACCGCGTGTACTAT TGTGCCAGAGGGGTGTACGGCGGCTTCGCTGGCGGCTACTTCGATTTTGGGGCCAG GGCACCTCTGTACCGTCAAGCTCA
81	Secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera de NOV0712	MVLQTVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQ QKPGKAPKLLIYAVSTLQSGVPSRFSGSGSDFTLTISLLOPEDFATYYCQSGTF PPTTFGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC
82	Secuencia de nucleótidos de longitud completa de la cadena ligera de NOV0712	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGATCTCCGGCGCGTAC GGCGAGATCCAGATGACCCAGAGCCCTAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGA GTGACCATCACCTGTAGAGCCAGCCAGGACATCAGCAGCTACCTGAACCTGGTATCAG CAGAAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAACTGCTGATCTACGCGGTGTCCACACTGCAGAGC GGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTACCCGTGACAATC AGCAGGCTGCAGCCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTGAGCAGTCCGGCACCTTC CCCCCACCACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGTACGGTGGCGCGC CCCTCGGTGTTTCATCTTCCCGCCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCGCTCC GTGGTGTGCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGCCAAGGTGAGTGAAGGTG GACAAGGCCCTGCAGTCCGGGAACCTCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGCAGCAAG GACAGCACCTACAGCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGCGGACTACGAGAAG CACAAAGGTGACCGCTGGGAGGTGACCCACCGAGGCGTGAAGTCCCGCGTACCAAG AGCTTCAACAGGGGGGAGTGT

(continuación)

83	Secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada de NOV0712	MKHLWFFLLVAAPRWVLSQVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHGMHWVR QAPGKGLEWVSVISSGGSNTGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYY CARQWGSYAFDSWGGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHPKPSN TKVDRKVEPKSCDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNKEYKKK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHY TKSLSLSPGK
----	--	---

[Tabla 1-15]

84	Secuencia de nucleótidos de longitud completa de la cadena pesada de NOV0712	ATGAAACACCTGTGGTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCAGATGGGTGCTGAGC CAGGTGCAGCTCCTGGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGTCTCTGAGA CTGTCTTGTGCCGCCAGCGCTTCACCTTCAGCAGCCAGGAATGCAGCTGGGTGCGC CAGGCCCTGGAAAGGGACTGGAATGGGTGTCCGTGATCAGCGGCGAGCGGTCCAAAT ACCGGCTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGTTACCATCAGCGGCGACAACAGCAAG AACACCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGGCGGCGAGGACACCGCGGTGTACTAT TGTGCCAGACAGTGGGCGAGCTACCGCTTCGATTCTTGGGCGCAGGCGACCGTCTGTG ACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTCCCGCTGGCAGCGCTCCTCC AAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCGCGCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCC GAACCGGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCGCTGACGAGCGCGGTGCACACCTTC CCCGCTGTCTCGAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGGTGGTGAACCGTGGCC TCAGCAGCTTGGGCACCCAGAGCTACATCTGCAAGTGAATCACAAGCGCGTGGAGGAG ACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACACACATGCCCA CGCTGCCAGCAGCTGAACCTCGTGGGGGAGCCTCAGTCTTCTCTTCCGCCCAAAA CCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGAGCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAG GTGAGCCACGAAGAGCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAGGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGGGTGGT AGCGTCTCAGCGTCTGACAGGAGTGGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAG GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACATCTCCAAGGCCAAAGGC CAGCCCCGGGAACCAAGGTGTACACCGTGGCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGAGCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGCCAGCGCGAGAACACTACAAGACACCGCTCCCGTGGT GACTCCGAGCGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGCAAGGTCTTCTCATGCTCCGTGATGTCATGAGGCTGACAGCAACCACTAG ACCCAGAAGAGCTCTCCTGTCTCCCGCAAA
----	--	---

5 En la presente descripción, Las Tablas 1-1 a 1-15 también se denominan colectivamente Tabla 1.

Los ejemplos adicionales del anticuerpo de la presente invención pueden incluir un anticuerpo humano que se une a CDH6. El anticuerpo humano anti-CDH6 significa un anticuerpo humano que tiene solo la secuencia genética de un anticuerpo derivado de cromosomas humanos. El anticuerpo humano anti-CDH6 puede obtenerse mediante un
10 método que usa un ratón productor de anticuerpos humanos que tiene un fragmento cromosómico humano que comprende los genes de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo humano (véase Tomizuka, K. *et al.*, Nature Genetics (1997) 16, p. 133-143; Kuroiwa, Y. *et al.*, Nucl. Acids Res. (1998) 26, p. 3447-3448; Yoshida, H. *et al.*, Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, p. 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. e Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p. 722-727; etc.).

15 Un ratón productor de anticuerpos humanos de este tipo puede producirse específicamente usando un animal modificado genéticamente, cuyos loci genéticos de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena se han interrumpido y en su lugar se han introducido los loci genéticos de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana usando un vector de cromosoma artificial de levadura (YAC) o similar, a continuación producir un animal
20 inactivado y un animal transgénico a partir de ese animal genéticamente modificado, y a continuación cruzar esos animales entre sí.

De otro modo, el anticuerpo humano anti-CDH6 también puede obtenerse transformando células eucariotas con ADNc que codifica cada una de las cadenas pesada y ligera de dicho anticuerpo humano, o preferentemente con un vector
25 que comprende el ADNc, de acuerdo con técnicas de recombinación genética, y a continuación cultivar las células transformadas produciendo un anticuerpo monoclonal humano modificado genéticamente, de tal manera que el anticuerpo pueda obtenerse del sobrenadante del cultivo.

En este contexto, las células eucariotas y, preferentemente, las células hospedadoras de mamífero tales como células CHO, linfocitos o mielomas pueden, por ejemplo, usarse como un hospedador.
30

Adicionalmente, un método para obtener un anticuerpo humano derivado de presentación en fagos que se ha seleccionado de una biblioteca de anticuerpos humanos (véase Wormstone, I. M. *et al.*, Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), p. 2301-2308; Carmen, S. *et al.*, Briefings in Functional Genomics and Proteomics

(2002), 1 (2), p. 189-203; Siriwardena, D. *et al.*, Ophthalmology (2002) 109 (3), p. 427-431; etc.) también es conocido.

Por ejemplo, un método de visualización de fagos, que comprende permitir que las regiones variables de un anticuerpo humano se expresen como un anticuerpo de cadena única (scFv) en la superficie de los fagos, y a continuación seleccionar un fago que se une a un antígeno, puede aplicarse (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), p. 1105-1116).

Al analizar el gen del fago que se ha seleccionado por su capacidad de unión a antígeno, pueden determinarse las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de un anticuerpo humano que se une al antígeno.

Una vez determinada la secuencia de ADN de la unión del scFv al antígeno, se produce un vector de expresión que tiene la secuencia mencionada anteriormente y a continuación el vector de expresión producido se introduce en un hospedador apropiado y se le puede permitir expresarse en el mismo, obteniendo de esta manera un anticuerpo humano (Publicación Internacional N.º WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438 y WO95/15388, Annu. Rev. Immunol (1994) 12, p. 433-455, Nature Biotechnology (2005) 23 (9), p. 1105-1116).

Si un anticuerpo humano recién producido se une a un péptido parcial o a una estructura tridimensional parcial a la que cualquier anticuerpo anti-CDH6 humano de rata, anticuerpo anti-CDH6 humano quimérico o anticuerpo anti-CDH6 humano humanizado descrito en la presente descripción (por ejemplo, el anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056, el anticuerpo rG061, el anticuerpo chG019, el anticuerpo H01L02, el anticuerpo H02L02, el anticuerpo H02L03 o el anticuerpo H04L02) se une, puede determinarse que el anticuerpo humano se une al mismo epítipo al que el anticuerpo anti-CDH6 humano de rata, el anticuerpo anti-CDH6 humano quimérico o el anticuerpo anti-CDH6 humano humanizado se une. Como alternativa, al confirmar que el anticuerpo humano compite con el anticuerpo anti-CDH6 humano de rata, el anticuerpo anti-CDH6 humano quimérico o el anticuerpo anti-CDH6 humano humanizado descrito en la presente descripción (por ejemplo, el anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056, el anticuerpo rG061, el anticuerpo chG019, el anticuerpo H01L02, el anticuerpo H02L02, el anticuerpo H02L03 o el anticuerpo H04L02) en la unión del anticuerpo a CDH6 (por ejemplo, el anticuerpo humano interfiere con la unión del anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056, el anticuerpo rG061, el anticuerpo chG019, el anticuerpo H01L02, el anticuerpo H02L02, el anticuerpo H02L03 o el anticuerpo H04L02 a CDH6, preferentemente EC3 de CDH6), puede determinarse que el anticuerpo humano se une al mismo epítipo al que el anticuerpo anti-CDH6 humano de rata, el anticuerpo anti-CDH6 humano quimérico o el anticuerpo anti-CDH6 humano humanizado descrito en la presente descripción se une, incluso si no se ha determinado la secuencia o la estructura específicas del epítipo. En la presente descripción, cuando se determina mediante al menos uno de estos métodos de determinación que el anticuerpo humano "se une al mismo epítipo", se concluye que el anticuerpo humano recién preparado "se une al mismo epítipo" que el anticuerpo anti-CDH6 humano de rata, el anticuerpo anti-CDH6 humano quimérico o el anticuerpo anti-CDH6 humano humanizado descrito en la presente descripción. Cuando se confirma que el anticuerpo humano se une al mismo epítipo, entonces se espera que el anticuerpo humano tenga una actividad biológica equivalente a la del anticuerpo anti-CDH6 humano de rata, el anticuerpo anti-CDH6 humano quimérico o el anticuerpo anti-CDH6 humano humanizado (por ejemplo, el anticuerpo rG019, el anticuerpo rG055, el anticuerpo rG056, el anticuerpo rG061, el anticuerpo chG019, el anticuerpo H01L02, el anticuerpo H02L02, el anticuerpo H02L03 o el anticuerpo H04L02).

Los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanizados o los anticuerpos humanos obtenidos por los métodos descritos anteriormente se evalúan en cuanto a su actividad de unión contra el antígeno de acuerdo con un método conocido, etc., de tal manera que pueda seleccionarse un anticuerpo preferido.

Un ejemplo de otro indicador para comparar las propiedades de los anticuerpos puede incluir la estabilidad de un anticuerpo. Un calorímetro diferencial de barrido (DSC) es un aparato capaz de medir de forma rápida y exacta un punto medio de desnaturalización térmica (T_m), sirviendo como un buen indicador de la estabilidad estructural relativa de una proteína. Usando DSC para medir los valores de T_m y haciendo una comparación con los valores obtenidos, pueden compararse las diferencias en la estabilidad térmica. Se sabe que la estabilidad de conservación de un anticuerpo tiene una cierta correlación con la estabilidad térmica del anticuerpo (Lori Burton, *et al.*, Pharmaceutical Development and Technology (2007) 12, p. 265-273) y, por lo tanto, puede seleccionarse un anticuerpo preferido usando la estabilidad térmica como un indicador. Otros ejemplos del indicador para la selección de un anticuerpo pueden incluir un alto rendimiento en células hospedadoras adecuadas y una baja aglutinación en una solución acuosa. Por ejemplo, dado que un anticuerpo con el mayor rendimiento no siempre exhibe la mayor estabilidad térmica, es necesario seleccionar el anticuerpo más adecuado para su administración a un ser humano determinándolo exhaustivamente en función de los indicadores antes mencionados.

El anticuerpo de la presente invención también incluye una modificación de un anticuerpo. La modificación se usa para significar el anticuerpo de la presente invención, que está modificado químicamente o biológicamente. Los ejemplos de dicha modificación química incluyen la unión de una fracción química a un esqueleto de aminoácido y la modificación química de una cadena de carbohidratos ligada a N o ligada a O. Los ejemplos de dicha modificación biológica incluyen anticuerpos que han sufrido una modificación postraducciona (por ejemplo, glucosilación ligada a N o ligada a O, procesamiento N-terminal o C-terminal, desamidación, isomerización de ácido aspártico, oxidación de la metionina y conversión de glutamina N-terminal o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico) y anticuerpos, al extremo N

del cual se añade un resto de metionina como resultado de haber permitido expresarlo usando células hospedadoras procariotas. Además, una modificación tal también pretende incluir anticuerpos marcados para permitir la detección o el aislamiento del anticuerpo de la presente invención o un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo marcado enzimáticamente, un anticuerpo marcado con fluorescencia y un anticuerpo marcado por afinidad. Una modificación tal del anticuerpo de la presente invención es útil para la mejora de la estabilidad y la retención en sangre de un anticuerpo; una reducción de la antigenicidad; detección o aislamiento de un anticuerpo o un antígeno; etc.

Por otra parte, regulando una modificación de la cadena de azúcar (glucosilación, desfucosilación, etc.) que se une al anticuerpo de la presente invención, puede mejorarse la actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpos. Como técnicas para regular la modificación de la cadena de azúcar de un anticuerpo, aquellas descritas en las Publicaciones Internacionales N.º WO1999/54342, WO2000/61739 y WO2002/31140, etc. son conocidas, aunque las técnicas no se limitan a las mismas. El anticuerpo de la presente invención también incluye anticuerpos respecto de los cuales se ha regulado la modificación de la cadena de azúcar mencionada anteriormente.

Una vez que se aísla un gen de anticuerpo, el gen puede introducirse en un hospedador apropiado para producir un anticuerpo, usando una combinación apropiada de un hospedador y un vector de expresión. Un ejemplo específico del gen del anticuerpo puede ser una combinación de un gen que codifica la secuencia de cadena pesada del anticuerpo descrito en la presente descripción y un gen que codifica la secuencia de cadena ligera del anticuerpo descrito en la misma. Tras la transformación de las células hospedadoras, dicho gen de secuencia de cadena pesada y dicho gen de secuencia de cadena ligera pueden insertarse en un único vector de expresión, o bien estos genes pueden insertarse cada uno en vectores de expresión diferentes.

Cuando se usan células eucariotas como hospedadores, pueden usarse células animales, células vegetales o microorganismos eucariotas. En particular, los ejemplos de células animales pueden incluir células de mamíferos tales como células COS que son células de mono (Gluzman, Y., Cell (1981) 23, p. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos de ratón NIH3T3 (ATCC N.º CRL-1658), una línea celular deficiente en dihidrofolato reductasa de células de ovario de hámster chino (células CHO, ATCC CCL-61) (Urlaub, G. y Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980) 77, p. 4126-4220) y células FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.).

Cuando se usan células procariotas como hospedadores, pueden usarse *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, por ejemplo.

Un gen de anticuerpo de interés se introduce en estas células para transformación y las células transformadas se cultivan a continuación *in vitro* para obtener un anticuerpo. En el cultivo mencionado anteriormente, hay casos en que el rendimiento es diferente dependiendo de la secuencia del anticuerpo y, por lo tanto, es posible seleccionar un anticuerpo, que se produce fácilmente como un medicamento, de anticuerpos que tienen una actividad de unión equivalente, usando el rendimiento como un indicador. En consecuencia, el anticuerpo de la presente invención también incluye un anticuerpo obtenido mediante el método descrito anteriormente para producir un anticuerpo, que comprende una etapa de cultivo de las células hospedadoras transformadas y una etapa de recolección de un anticuerpo de interés o un fragmento funcional del anticuerpo del cultivo obtenido en la etapa mencionada anteriormente.

Se sabe que el resto de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en células de mamíferos cultivadas se elimina (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)) y también, se sabe que los dos restos de aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de la cadena pesada, glicina y lisina, se eliminan y que el resto de prolina recién posicionado en el extremo carboxilo terminal se amida (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Sin embargo, una eliminación y modificación tales de estas secuencias de cadena pesada no tiene influencia en la actividad de unión a antígeno y la función efectora (activación del complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, etc.) de un anticuerpo. En consecuencia, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención también incluye un anticuerpo que ha sido sometido a la modificación mencionada anteriormente, y un fragmento funcional del anticuerpo, y ejemplos específicos de dicho anticuerpo incluyen un mutante de eliminación que comprende una eliminación de 1 o 2 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de la cadena pesada, y un mutante de eliminación formado mediante la amidación del mutante de eliminación antes mencionado (por ejemplo, una cadena pesada en la cual el resto de prolina en el sitio carboxilo terminal está amidado). Sin embargo, los mutantes de eliminación que implican una eliminación en el extremo carboxilo terminal de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la presente invención no se limitan a los mutantes de eliminación descritos anteriormente, siempre que conserven la actividad de unión a antígeno y la función efectora. Dos cadenas pesadas que constituyen el anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden ser una cualquiera de un tipo de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo de longitud completa y los mutantes de eliminación descritos anteriormente, o pueden ser una combinación de cualquiera de los dos tipos seleccionados del grupo mencionado anteriormente. La proporción de mutantes de eliminación individuales puede verse influenciada por los tipos de células de mamíferos cultivadas que producen el anticuerpo de acuerdo con la presente invención y las condiciones de cultivo. Los ejemplos del ingrediente principal del anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden incluir anticuerpos en que se elimina un resto de aminoácido en cada uno de los extremos carboxilo de las dos cadenas pesadas.

Los ejemplos del isotipo del anticuerpo de la presente invención pueden incluir IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4). Entre

otros, son preferibles IgG1 e IgG4.

Los ejemplos de la actividad biológica de un anticuerpo generalmente pueden incluir actividad de unión a antígeno, actividad de internalizarse en células que expresan un antígeno al unirse al antígeno, actividad de neutralizar la actividad de un antígeno, actividad de potenciar la actividad de un antígeno, actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), actividad citotóxica dependiente del complemento (CDC) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). La función del anticuerpo de acuerdo con la presente invención es la actividad de unión contra CDH6 y es preferentemente la actividad de internalizarse en células que expresan CDH6 mediante la unión a CDH6. Por otra parte, el anticuerpo de la presente invención puede tener actividad ADCC, actividad CDC y/o actividad ADCP, así como actividad de internalización celular.

El anticuerpo obtenido puede purificarse hasta un estado homogéneo. Para la separación y la purificación del anticuerpo, pueden usarse métodos de separación y purificación usados para proteínas habituales. Por ejemplo, cromatografía en columna, filtración, ultrafiltración, extracción por saturación de sal, diálisis, electroforesis en gel de poliacrilamida preparativa e isoelectroenfoque se seleccionan apropiadamente y se combinan entre sí, para que el anticuerpo pueda separarse y purificarse (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak *et al.* eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); y Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), aunque los ejemplos de los métodos de separación y purificación no se limitan a los mismos.

Los ejemplos de la cromatografía pueden incluir cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de fase inversa y cromatografía de absorción.

Estas técnicas cromatográficas pueden llevarse a cabo usando cromatografía líquida tal como HPLC o FPLC.

Los ejemplos de la columna usada en la cromatografía de afinidad pueden incluir una columna de proteína A y una columna de proteína G. Los ejemplos de la columna que implica el uso de proteína A pueden incluir Hyper D, POROS y Sepharose F. F. (Farmacia).

También, usando un vehículo inmovilizado con antígeno, el anticuerpo puede purificarse usando la actividad de unión del anticuerpo al antígeno.

3. Conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco

(1) Fármaco

El anticuerpo anti-CDH6 obtenido en el anterior "2. Producción de anticuerpos anti-CDH6" puede conjugarse con un fármaco a través de una fracción de estructura de enlazador para preparar un conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco. El fármaco no está particularmente limitado siempre que tenga un sustituyente o una estructura parcial que pueda conectarse a una estructura de enlazador. El conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco puede usarse para diversos fines de acuerdo con el fármaco conjugado. Los ejemplos de un fármaco tal pueden incluir sustancias que tengan actividad antitumoral, sustancias eficaces para las enfermedades de la sangre, sustancias eficaces para las enfermedades autoinmunitarias, sustancias antiinflamatorias, sustancias antimicrobianas, sustancias antifúngicas, sustancias antiparasitarias, sustancias antivíricas y sustancias antianestésicas.

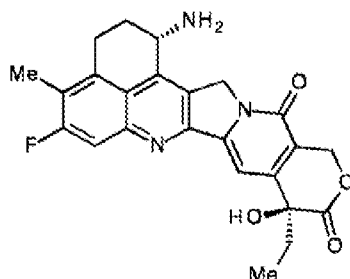
(1)-1 Compuesto antitumoral

A continuación se describirá un ejemplo que usa un compuesto antitumoral como un compuesto a conjugar en el conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco de la presente invención. El compuesto antitumoral no está particularmente limitado siempre que el compuesto tenga un efecto antitumoral y tenga un sustituyente o una estructura parcial que pueda conectarse a una estructura de enlazador. Tras la escisión de una parte o de la totalidad del enlazador en las células tumorales, la fracción del compuesto antitumoral se libera de tal manera que el compuesto antitumoral exhibe un efecto antitumoral. A medida que el enlazador se escinde en una posición de conexión con el fármaco, el compuesto antitumoral se libera en su estructura original para ejercer su efecto antitumoral original.

El anticuerpo anti-CDH6 obtenido en el anterior "2. Producción de anticuerpos anti-CDH6" puede conjugarse con el compuesto antitumoral a través de una fracción de estructura de enlazador para preparar un conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco.

Como un ejemplo del compuesto antitumoral usado en la presente invención, exatecán, un derivado de camptotecina ((1S,9S)-1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolina-10,13(9H,15H)-diona representada por la siguiente fórmula) puede usarse preferentemente.

[Fórmula 5]



El compuesto puede obtenerse fácilmente mediante, por ejemplo, un método descrito en la publicación de patente de EE.UU. N.º US2016/0297890 u otros métodos conocidos, y el grupo amino en la posición 1 puede usarse preferentemente como una posición de conexión a la estructura del enlazador. Además, el exatecán puede liberarse en las células tumorales mientras una parte del enlazador todavía está adherida a las mismas. Sin embargo, el compuesto ejerce un excelente efecto antitumoral incluso en ese estado.

Dado que el exatecán tiene una estructura de camptotecina, se sabe que el equilibrio se desplaza a una estructura con un anillo de lactona formado (anillo cerrado) en un medio acuoso ácido (por ejemplo, del orden de pH 3), mientras que el equilibrio se desplaza a una estructura con un anillo de lactona abierto (anillo abierto) en un medio acuoso básico (por ejemplo, del orden de pH 10). También se espera que un conjugado de fármaco en el cual se han introducido restos de exatecán correspondientes a dicha estructura de anillo cerrado y a una estructura de anillo abierto tenga un efecto antitumoral equivalente, y no es necesario decir que cualquiera de dichos conjugados de fármaco está incluido dentro del alcance de la presente invención.

Otros ejemplos del compuesto antitumoral pueden incluir compuestos antitumorales descritos en la bibliografía (Pharmacological Reviews, 68, p. 3-19, 2016). Los ejemplos específicos del mismo pueden incluir doxorubicina, calicheamicina, dolastatina 10, auristatinas tales como monometil auristatina E (MMAE) y monometil auristatina F (MMAF), maitansinoides tales como DM1 y DM4, un dímero de pirrolobenzodiazepina SG2000 (SJG-136), un derivado de camptotecina SN-38, duocarmicinas tales como CC-1065, amanitina, daunorubicina, mitomicina C, bleomicina, ciclocitidina, vincristina, vinblastina, metotrexato, agentes antitumorales basados en platino (cisplatino y derivados del mismo) y Taxol y derivados del mismo.

En el conjugado de anticuerpo y fármaco, el número de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo es un factor clave que influye en la eficacia y seguridad del mismo. La producción del conjugado de anticuerpo y fármaco se lleva a cabo especificando las condiciones de reacción tales como las cantidades de materiales de partida y reactivos usados para la reacción, de tal manera que se alcance un número constante de moléculas de fármaco conjugadas. A diferencia de la reacción química de un compuesto de bajo peso molecular, habitualmente se obtiene una mezcla que contiene diferentes cantidades de moléculas de fármaco conjugado. El número de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo se define y se indica como un valor promedio, es decir, el número promedio de moléculas de fármaco conjugado. Salvo que se indique lo contrario, es decir, excepto en el caso de representar un conjugado de anticuerpo y fármaco que tiene un número específico de moléculas de fármaco conjugado que está incluido en una mezcla de conjugado de anticuerpo y fármaco que tiene diferentes números de moléculas de fármaco conjugado, el número de moléculas de fármaco conjugado de acuerdo con la presente invención también significa, por regla general, un valor promedio. El número de moléculas de exatecán conjugadas con una molécula de anticuerpo es controlable y, como un número promedio de moléculas de fármaco conjugado por anticuerpo, pueden conjugarse aproximadamente de 1 a 10 moléculas de exatecán. El número de moléculas de exatecán es preferentemente de 2 a 8, de 3 a 8, de 4 a 8, de 5 a 8, de 6 a 8 o de 7 a 8, más preferentemente de 5 a 8, además preferentemente de 7 a 8, aún más preferentemente 8. Debe tenerse en cuenta que un experto en la materia puede diseñar una reacción para conjugar una cantidad requerida de moléculas de fármaco con una molécula de anticuerpo basándose en la descripción de los Ejemplos de la presente solicitud y puede obtenerse un conjugado de anticuerpo y fármaco con una cantidad controlada de moléculas de exatecán conjugadas.

(2) Estructura del enlazador

Se describirá la estructura del enlazador que conjuga el fármaco al anticuerpo anti-CDH6 en el conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco de la presente invención.

En el conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente solicitud, la estructura del enlazador que conjuga el anticuerpo anti-CDH6 con el fármaco no está particularmente limitada siempre que pueda usarse el conjugado de anticuerpo y fármaco resultante. La estructura del enlazador puede seleccionarse y usarse apropiadamente según el propósito de uso. Un ejemplo de la estructura del enlazador puede incluir un enlazador descrito en la bibliografía conocida (Pharmacol Rev 68: 3-19, enero de 2016, Protein Cell DOI 10.1007/s13238-016-0323-0, etc.). Otros ejemplos

específicos de los mismos pueden incluir VC (valina-citrulina), MC (maleimidocaproilo), SMCC (4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo), SPP (4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo), SS (disulfuro), SPDB (4-(2-piridilditio)butirato de N-succinimidilo), SS/hidrazona, hidrazona y carbonato.

- 5 Otro ejemplo puede incluir una estructura de enlazador descrita en la Publicación de Patente de EE.UU. N.º US2016/0297890 (como un ejemplo, las descritas en los párrafos [0260] a [0289] de la misma). Puede usarse preferentemente cualquier estructura de enlazador dada a continuación. Debe tenerse en cuenta que el extremo izquierdo de la estructura es una posición de conexión con el anticuerpo, y el extremo derecho de la misma es una posición de conexión con el fármaco. Adicionalmente, GGFG en las estructuras de enlazador dadas a continuación
- 10 representa una secuencia de aminoácidos que consiste en glicina-glicina-fenilalanina-glicina (GGFG) enlazadas a través de enlaces peptídicos.

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
 - 15 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)- y
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.
- 20

Los más preferidos son los siguientes:

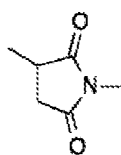
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)- y
- 25 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

Los aún más preferidos son los siguientes:

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)- y
- 30 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

- El anticuerpo está conectado al extremo de -(Succinimid-3-il-N) (por ejemplo, un extremo opuesto (extremo izquierdo) al extremo al cual -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂- está conectado en "-(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-" y el compuesto antitumoral está conectado a un extremo (el grupo carbonilo de CH₂-O-CH₂-C(=O)- en el extremo derecho en el ejemplo descrito anteriormente) opuesto al extremo al cual el anticuerpo está conectado a -(Succinimid-3-il-N). "-(Succinimid-3-il-N)-" tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:
- 35

[Fórmula 6]



- 40 La posición 3 de esta estructura parcial es la posición de conexión al anticuerpo anti-CDH6. Esta conexión con el anticuerpo en la posición 3 se caracteriza por formar un enlace tioéter. El átomo de nitrógeno en la posición 1 de esta fracción estructural está conectado al átomo de carbono de metileno que está presente dentro del enlazador que incluye la estructura.

- 45 En el conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención que tiene exatecán como el fármaco, se prefiere una fracción de estructura de enlazador de fármaco que tenga cualquier estructura que se detalla a continuación para la conjugación con el anticuerpo. Para estas fracciones de estructura de enlazador de fármaco, el número promedio conjugado por anticuerpo puede ser de 1 a 10 y preferentemente de 2 a 8, más preferentemente de 5 a 8, además preferentemente de 7 a 8 y aún más preferentemente 8.

- 50
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - 55 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX) y
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

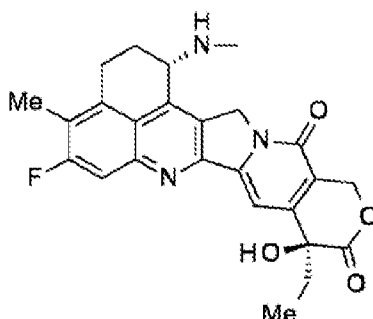
Los más preferidos son los siguientes:

- 5 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX),
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX) y
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).

Los aún más preferidos son los siguientes:

- 10
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-(NH-DX) y
 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-(NH-DX).
- 15
- (NH-DX) tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 7]



- 20 y representa un grupo que deriva de la eliminación de un átomo de hidrógeno del grupo amino en la posición 1 del exatecán.

(3) Método para producir conjugado de anticuerpo y fármaco

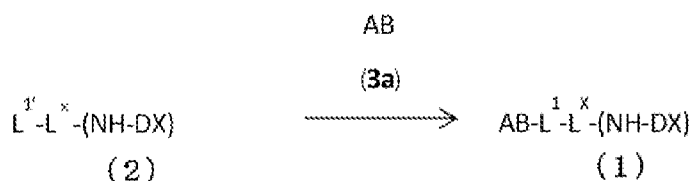
- 25 El anticuerpo que puede usarse en el conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención no está particularmente limitado siempre que sea un anticuerpo anti-CDH6 que tenga actividad de internalización o un fragmento funcional del anticuerpo, como se describe en la sección anterior "2. Producción de anticuerpos anti-CDH6" y los Ejemplos.

- 30 A continuación, se describirá un método típico para producir el conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención. Debe tenerse en cuenta que, en la siguiente descripción, "N.º de compuesto" mostrado en cada esquema de reacción se usa para representar un compuesto. Específicamente, cada compuesto se denomina un "compuesto de fórmula (1)", "compuesto (1)" o similares. Lo mismo se aplica a los otros N.º de compuestos.

(3)-1 Método de producción 1

- El conjugado de anticuerpo y fármaco representado por la fórmula (1) dado a continuación en el cual el anticuerpo anti-CDH6 está conectado a la estructura de enlazador a través de un tioéter puede producirse haciendo reaccionar un anticuerpo que tiene un grupo sulfhidrilo convertido a partir de un enlace disulfuro mediante la reducción del anticuerpo anti-CDH6, con el compuesto (2), siendo el compuesto (2) obtenible mediante un método conocido (por ejemplo, obtenible mediante un método descrito en la bibliografía de publicación de patente US2016/297890 (por ejemplo, un método descrito en los párrafos [0336] a [0374])). Este conjugado de anticuerpo y fármaco puede producirse mediante el siguiente método, por ejemplo.

[Expresión 1]



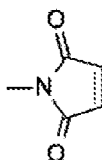
en donde AB representa un anticuerpo con un grupo sulfhidrilo,

5 en donde

L¹ tiene una estructura representada por -(Succinimid-3-il-N)- y

L¹ representa un grupo maleimidilo representado por la siguiente fórmula.

[Fórmula 8]



10

-L¹-L^x tiene una estructura representada por cualquiera de las siguientes fórmulas:

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,
- 15 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)- y
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

20

Entre ellas, las más preferidas son las siguientes:

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,
- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)- y
- 25 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

Se prefieren además las siguientes:

- (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)- y
- 30 - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

En el esquema de reacción descrito anteriormente, el conjugado de anticuerpo y fármaco (1) puede entenderse que tiene una estructura en la cual una fracción estructural desde el fármaco hasta el extremo del enlazador está conectada a un anticuerpo. Sin embargo, esta descripción se da por conveniencia y, en realidad, hay muchos casos en los cuales una pluralidad de las fracciones estructurales mencionadas anteriormente están conectadas a una molécula de anticuerpo. Lo mismo se aplica a la explicación del método de producción que se describe a continuación.

35

Específicamente, el conjugado de anticuerpo y fármaco (1) puede producirse haciendo reaccionar el compuesto (2) obtenible mediante un método conocido (por ejemplo, obtenible mediante un método descrito en la bibliografía de publicación de patente US2016/297890 (por ejemplo, obtenible mediante un método descrito en los párrafos [0336] a [0374])), con el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo.

40

El anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo puede obtenerse mediante un método bien conocido por una persona experta en la materia (Hermanson, G.T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996)). Los ejemplos del método pueden incluir, pero no se limitan a: Reactivo de Traut que reacciona con el grupo amino del anticuerpo; S-acetilthioalcanoatos de N-succinimidilo que reaccionan con el grupo amino del anticuerpo seguido de una reacción con hidroxilamina; 3-(piridilditio)propionato de N-succinimidilo que reacciona con el anticuerpo, seguido de reacción con un agente reductor; el anticuerpo que reacciona con un agente reductor tal como ditiotritol, 2-

45

mercaptoetanol o clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) para reducir el enlace disulfuro intracatenario en el anticuerpo, de tal manera que se forme un grupo sulfhidrilo.

Específicamente, puede obtenerse un anticuerpo con enlaces disulfuro intracatenarios parcial o completamente reducidos usando de 0,3 a 3 equivalentes molares de TCEP como un agente reductor por enlace disulfuro intercatenario en el anticuerpo y haciendo reaccionar el agente reductor con el anticuerpo en una solución tampón que contenga un agente quelante. Los ejemplos del agente quelante pueden incluir ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA). El agente quelante puede usarse en una concentración de 1 mM a 20 mM. Una solución de fosfato sódico, borato sódico, acetato sódico o similares puede usarse como la solución tampón. Como un ejemplo específico, el anticuerpo (3a) que tiene grupos sulfhidrilo parcial o completamente reducidos puede obtenerse haciendo reaccionar el anticuerpo con TCEP a una temperatura de 4 °C a 37 °C durante 1 a 4 horas.

Cabe señalar que al llevar a cabo una reacción de adición de un grupo sulfhidrilo a una fracción enlazadora de fármaco, la fracción enlazadora del fármaco puede conjugarse mediante un enlace tioéter.

A continuación, usando de 2 a 20 equivalentes molares del compuesto (2) por anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo, puede producirse el conjugado de anticuerpo y fármaco (1) en el cual se conjugan de 2 a 8 moléculas de fármaco por anticuerpo. Específicamente, puede añadirse una solución que contiene el compuesto (2) disuelto en la misma a una solución tampón que contiene el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo para la reacción. En este contexto, una solución de acetato sódico, fosfato sódico, borato sódico o similares puede usarse como la solución tampón. El pH de la reacción es de 5 a 9 y, más preferentemente, la reacción puede realizarse cerca del pH 7. Un disolvente orgánico tal como dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), dimetilacetamida (DMA) o N-metil-2-pirrolidona (NMP) puede usarse como un disolvente para disolver el compuesto (2). La reacción puede realizarse añadiendo la solución que contiene el compuesto (2) disuelto en el disolvente orgánico del 1 al 20 % v/v a una solución tampón que contiene el anticuerpo (3a) que tiene un grupo sulfhidrilo. La temperatura de reacción es de 0 a 37 °C, más preferentemente de 10 a 25 °C, y el tiempo de sinterización es de 0,5 a 2 horas. La reacción puede terminarse desactivando la reactividad del compuesto no reaccionado (2) con un reactivo que contenga tiol. El reactivo que contiene tiol es, por ejemplo, cisteína o N-acetil-L-cisteína (NAC). Más específicamente, la reacción puede terminarse añadiendo de 1 a 2 equivalentes molares de NAC al compuesto (2) usado e incubando la mezcla obtenida a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos.

(4) Identificación del conjugado de anticuerpo y fármaco

El conjugado de anticuerpo y fármaco (1) producido puede someterse a concentración, intercambio de tampón, purificación y medición de la concentración de anticuerpos y del número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo de acuerdo con los procedimientos comunes que se describen a continuación, para identificar el conjugado de anticuerpo y fármaco (1).

(4)-1 Procedimiento común A: Concentración de solución acuosa de anticuerpo o conjugado de anticuerpo y fármaco

A un recipiente Amicon Ultra (50.000 MWCO, Millipore Corporation), se añadió una solución de un anticuerpo o un conjugado de anticuerpo y fármaco, y la solución del anticuerpo o del conjugado de anticuerpo y fármaco se concentró por centrifugación (centrifugación de 2000 G a 3800 G durante 5 a 20 minutos) usando una centrífuga (Allegra X-15R, Beckman Coulter, Inc.)

(4)-2 Procedimiento común B: Medición de la concentración de anticuerpos

Usando un detector UV (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.), la medición de la concentración de anticuerpos se llevó a cabo de acuerdo con el método definido por el fabricante. Con respecto a esto, se usó el coeficiente de absorción de 280 nm que difiere entre anticuerpos (1,3 mlmg⁻¹cm⁻¹ a 1,8 mlmg⁻¹cm⁻¹).

(4)-3 Procedimiento común C: Intercambio de tampón por anticuerpo

Una columna NAP-25 (N.º de Cat. 17-0852-02, GE Healthcare Japan Corporation) que usa el vehículo Sephadex G-25 se equilibró con un tampón fosfato (50 mM, pH 6,0) (denominado PBS6.0/EDTA en la presente descripción) que contiene cloruro sódico (50 mM) y EDTA (2 mM) de acuerdo con el método definido por el fabricante. Se aplicó una solución acuosa del anticuerpo en una cantidad de 2,5 ml por columna NAP-25 y, en lo sucesivo, se recogió una fracción (3,5 ml) eluida con 3,5 ml de PBS6.0/EDTA. Esta fracción se concentró mediante el procedimiento común A. Después de la medición de la concentración del anticuerpo usando el procedimiento común B, la concentración de anticuerpos se ajustó a 20 mg/ml usando PBS6.0/EDTA.

(4)-4 Procedimiento común D: Purificación del conjugado de anticuerpo y fármaco

Una columna NAP-25 se equilibró con cualquier solución tampón disponible en el mercado tal como un tampón acetato que contiene sorbitol (50) (10 mM, pH 5,5; denominado ABS en la presente descripción). Se aplicó una solución de reacción acuosa del conjugado de anticuerpo y fármaco (aproximadamente 2,5 ml) a la columna NAP-25 y, en lo

sucesivo, la elución se llevó a cabo con la solución tampón en una cantidad definida por el fabricante, de tal manera que se recoja una fracción de anticuerpos. Un proceso de purificación por filtración en gel, en el cual la fracción recogida se aplicó nuevamente a la columna NAP-25 y se llevó a cabo la elución con la solución tampón, se repitió un total de 2 o 3 veces para obtener el conjugado de anticuerpo y fármaco excluyendo el enlazador de fármaco no conjugado y los compuestos de bajo peso molecular (clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), N-acetil-L-cisteína (NAC) y dimetilsulfóxido).

(4)-5 Procedimiento común E: Medición de la concentración de anticuerpos en el conjugado de anticuerpo y fármaco y número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo

La concentración del fármaco conjugado en el conjugado de anticuerpo y fármaco puede calcularse midiendo la absorbancia UV de una solución acuosa del conjugado de anticuerpo y fármaco en dos longitudes de onda de 280 nm y 370 nm y en lo sucesivo realizando el cálculo mostrado a continuación.

La absorbancia total en cualquier longitud de onda dada es igual a la suma de la absorbancia de todas las especies químicas que absorben luz y que están presentes en un sistema [aditividad de la absorbancia]. Por lo tanto, basado en la hipótesis de que los coeficientes de absorción molar del anticuerpo y el fármaco no varían entre antes y después de la conjugación entre el anticuerpo y el fármaco, la concentración de anticuerpos y la concentración del fármaco en el conjugado de anticuerpo y fármaco se representan mediante las siguientes ecuaciones.

$$A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280}C_D + \epsilon_{A,280}C_A \text{ Ecuación (1)}$$

$$A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370}C_D + \epsilon_{A,370}C_A \text{ Ecuación (2)}$$

En este contexto, A_{280} representa la absorbancia de una solución acuosa del conjugado de anticuerpo y fármaco a 280 nm, A_{370} representa la absorbancia de una solución acuosa del conjugado de anticuerpo y fármaco a 370 nm, $A_{A,280}$ representa la absorbancia del anticuerpo a 280 nm, $A_{A,370}$ representa la absorbancia del anticuerpo a 370 nm, $A_{D,280}$ representa la absorbancia de un precursor conjugado a 280 nm, $A_{D,370}$ representa la absorbancia de un precursor conjugado a 370 nm, $\epsilon_{A,280}$ representa el coeficiente de absorción molar del anticuerpo a 280 nm, $\epsilon_{A,370}$ representa el coeficiente de absorción molar del anticuerpo a 370 nm, $\epsilon_{D,280}$ representa el coeficiente de absorción molar de un precursor conjugado a 280 nm, $\epsilon_{D,370}$ representa el coeficiente de absorción molar de un precursor conjugado a 370 nm, C_A representa la concentración de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo y fármaco y C_D representa la concentración del fármaco en el conjugado de anticuerpo y fármaco.

En este contexto, con respecto a $\epsilon_{A,280}$, $\epsilon_{A,370}$, $\epsilon_{D,280}$ y $\epsilon_{D,370}$, se usan valores preparados preliminarmente (valores estimados basados en cálculos o valores de medición obtenidos mediante medición UV del compuesto). Por ejemplo, $\epsilon_{A,280}$ puede estimarse a partir de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo mediante un método de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). $\epsilon_{A,370}$ es generalmente cero. $\epsilon_{D,280}$ y $\epsilon_{D,370}$ pueden obtenerse de acuerdo con la ley de Lambert-Beer (Absorbancia = Concentración molar $\times$ Coeficiente de absorción molar $\times$ Longitud del recorrido celular) midiendo la absorbancia de una solución en la cual el precursor conjugado usado se disuelve a una determinada concentración molar. C_A y C_D pueden determinarse midiendo A_{280} y A_{370} de una solución acuosa del conjugado de anticuerpo y fármaco y a continuación resolver las ecuaciones simultáneas (1) y (2) mediante la sustitución de estos valores. Además, dividiendo C_D entre C_A , puede determinarse el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas por anticuerpo.

(4)-6 Procedimiento común F: Medición del número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo y fármaco - (2)

El número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo y fármaco también puede determinarse mediante análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) usando el siguiente método, además del anteriormente mencionado "(4)-5 Procedimiento común E". En lo sucesivo en el presente documento, se describirá el método para medir el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas mediante HPLC cuando el anticuerpo está conjugado al enlazador de fármaco mediante un enlace disulfuro. Un experto en la materia es capaz de medir adecuadamente el número promedio de moléculas de fármaco conjugadas mediante HPLC, dependiendo de la forma de conexión entre el anticuerpo y el enlazador de fármaco, con referencia a este método.

F-1. Preparación de muestra para análisis HPLC

(Reducción de conjugado de anticuerpo y fármaco)

Una solución de conjugado de anticuerpo y fármaco (aproximadamente 1 mg/ml, 60 μ l) se mezcla con una solución acuosa de ditioneitol (DTT) (100 mM, 15 μ l). Incubando la mezcla a 37 °C durante 30 minutos, se escinde el enlace

disulfuro entre la cadena ligera y la cadena pesada del conjugado de anticuerpo y fármaco. La muestra resultante se usa en el análisis HPLC.

F-2. Análisis HPLC

5

El análisis HPLC se lleva a cabo en las siguientes condiciones de medición.

- 10 Sistema de HPLC: Sistema HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies, Inc.)
 Detector: Espectrómetro de absorción ultravioleta (longitud de onda de medición: 280 nm)
 Columna: ACQUITY UPLC BEH Fenilo (2,1 × 50 mm, 1,7 μm, 130 angstroms; Waters Corp., PiN 186002884)
 Temperatura de la columna: 80 °C
 Fase móvil A: Solución acuosa que contiene ácido trifluoroacético (TFA) al 0,10 % y 2-propanol al 15 %
 Fase móvil B: Solución de acetonitrilo que contiene TFA al 0,075 % y 2-propanol al 15 %
 Programa de gradiente: 14 %-36 % (0 min-15 min), 36 %-80 % (15 min-17 min), 80 %-14 % (17 min-17,01 min.) y
 15 14 % (17,01 min-25 min)
 Inyección de muestra: 10 μl

F-3. Análisis de los datos

- 20 F-3-1. En comparación con las cadenas ligeras (L0) y pesadas (H0) de anticuerpos no conjugados, una cadena ligera unida a molécula o moléculas de fármaco (cadena ligera unida a i molécula o moléculas de fármaco): L_i) y una cadena pesada unida a molécula o moléculas de fármaco (cadena pesada unida a i molécula o moléculas de fármaco: H_i) exhiben una mayor hidrofobicidad en proporción al número de moléculas de fármaco conjugado y, por lo tanto, tienen un mayor tiempo de retención. Por lo tanto, estas cadenas se eluyen en el orden de, por ejemplo, L0 y L1 o H0, H1,
 25 H2 y H3. Los máximos de detección pueden asignarse a cualquiera de L0, L1, H0, H1, H2 y H3 mediante la comparación de los tiempos de retención con L0 y H0. El número de moléculas de fármaco conjugadas puede definirse por una persona experta en la materia, pero es preferentemente L0, L1, H0, H1, H2 y H3.

- 30 F-3-2. Dado que el enlazador de fármacos tiene absorción UV, los valores del área máxima se corrigen en respuesta al número de moléculas de enlazador de fármaco conjugado de acuerdo con la siguiente expresión usando los coeficientes de absorción molar de la cadena ligera o la cadena pesada y el enlazador de fármaco.

[Expresión 2]

Valor corregido del área máxima de la cadena ligera unida a i molécula o moléculas de fármaco (A_{Li}) = Área máxima

$$\times \frac{\text{Coeficiente de absorción molar de la cadena ligera}}{\text{Coeficiente de absorción molar de la cadena ligera} + \text{El número de moléculas (i) de fármaco conjugadas} \times \text{Coeficiente de absorción molar de enlazador de fármaco}}$$

[Expresión 3]

Valor corregido del área máxima de la cadena pesada unida a i molécula o moléculas de fármaco (A_{Hi}) = Área máxima

Coeficiente de absorción molar de la cadena pesada

$$\frac{\text{Coeficiente de absorción molar de la cadena pesada}}{\text{Coeficiente de absorción molar de la cadena pesada} + \text{El número de moléculas (i) de fármaco conjugadas} \times \text{Coeficiente de absorción molar de enlazador de fármaco}}$$

- 35 En este contexto, un valor estimado a partir de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera o de la cadena pesada de cada anticuerpo mediante un método de cálculo conocido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423) puede usarse como el coeficiente de absorción molar (280 nm) de la cadena ligera o de la cadena pesada del anticuerpo. En el caso de H01L02, se usaron como valores estimados un coeficiente de absorción molar de 31710 y un coeficiente de absorción molar de 79990 para la cadena ligera y la cadena pesada, respectivamente, de acuerdo con la secuencia
 40 de aminoácidos del anticuerpo. El coeficiente de absorción molar realmente medido (280 nm) de un compuesto en el cual el grupo maleimida se ha convertido en tioéter de succinimida mediante la reacción de cada enlazador de fármaco con mercaptoetanol o N-acetilcisteína se usó como el coeficiente de absorción molar (280 nm) del enlazador de fármaco. La longitud de onda para la medición de la absorbancia puede ajustarse apropiadamente por una persona experta en la materia, pero es preferentemente una longitud de onda en la cual puede medirse el máximo del
 45 anticuerpo, y más preferentemente 280 nm.

F-3-3. La relación del área máxima (%) de cada cadena se calcula para el total de los valores corregidos de las áreas máximas de acuerdo con la siguiente expresión.

[Expresión 4]

$$\text{Relación del área máxima de la cadena ligera unida a } i \text{ molécula o moléculas de fármaco} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

$$\text{Relación del área máxima de la cadena pesada unida a } i \text{ molécula o moléculas de fármaco} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

5

A_{Li} y A_{Hi} . Valores corregidos de las áreas máximas de L_i y H_i , respectivamente

F-3-4. El número promedio de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo en el conjugado de anticuerpo y fármaco se calcula de acuerdo con la siguiente expresión.

10

Número promedio de moléculas de fármaco conjugadas = $(L_0 \text{ relación del área máxima} \times 0 + L_1 \text{ relación del área máxima} \times 1 + H_0 \text{ relación del área máxima} \times 0 + H_1 \text{ relación del área máxima} \times 1 + H_2 \text{ relación del área máxima} \times 2 + H_3 \text{ relación del área máxima} \times 3) / 100 \times 2$

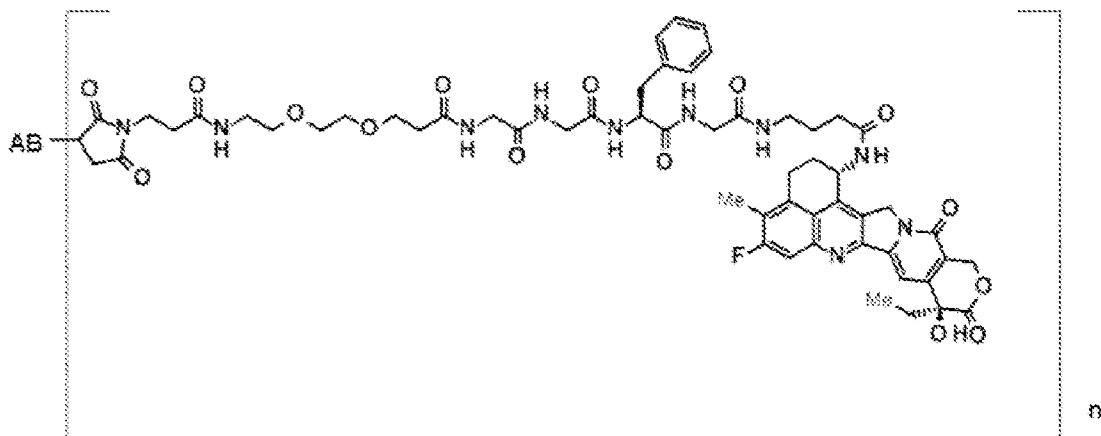
15

Debe tenerse en cuenta que, para asegurar la cantidad del conjugado de anticuerpo y fármaco, una pluralidad de conjugados de anticuerpo y fármaco que tienen casi el mismo número promedio de moléculas de fármaco conjugadas (por ejemplo, del orden de ± 1), que se han producido en condiciones similares, puede mezclarse para preparar un nuevo lote. En este caso, el número promedio de moléculas de fármaco del nuevo lote se encuentra entre el número promedio de moléculas de fármaco antes de la mezcla.

20

Un ejemplo específico del conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención puede incluir un conjugado de anticuerpo y fármaco que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

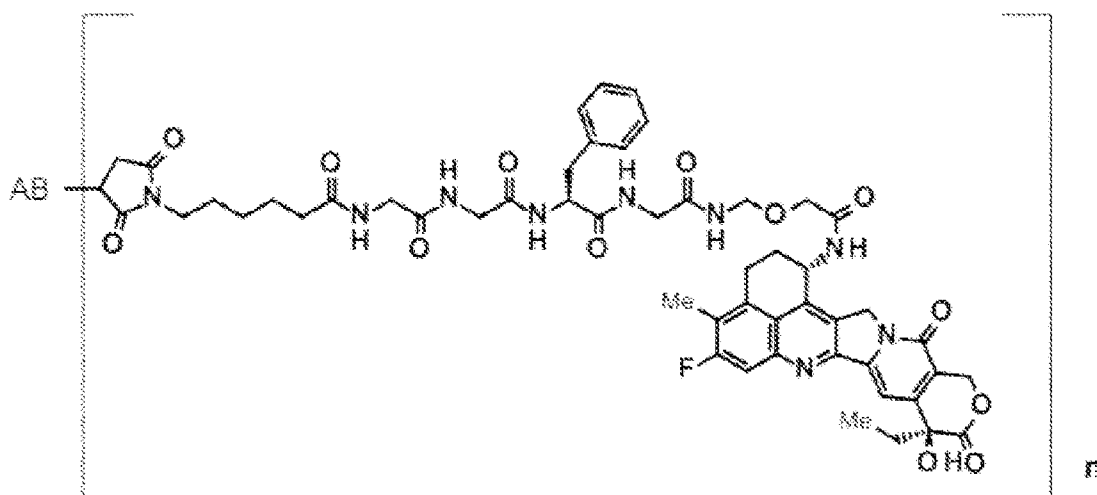
[Fórmula 9]



25

o la siguiente fórmula:

[Fórmula 10]



En este contexto, AB representa el anticuerpo anti-CDH6 desvelado en la presente descripción y el anticuerpo está conjugado con el enlazador del fármaco a través de un grupo sulfhidrilo que proviene del anticuerpo. En este contexto, n tiene el mismo significado que la denominada DAR (relación de fármaco a anticuerpo, por sus siglas en inglés) y representa una relación de fármaco a anticuerpo por anticuerpo. Específicamente, n representa el número de moléculas de fármaco conjugado por molécula de anticuerpo, que es un valor numérico definido e indicado como un valor promedio, es decir, el número promedio de moléculas de fármaco conjugado. En el caso del conjugado de anticuerpo y fármaco representado por la [Fórmula 9] o la [Fórmula 10] de la presente invención, n puede ser de 2 a 8 y es preferentemente de 5 a 8, más preferentemente de 7 a 8 y aún más preferentemente 8, en medición por el procedimiento común F.

Un ejemplo del conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención puede incluir un conjugado de anticuerpo y fármaco que tiene una estructura representada por la fórmula descrita anteriormente [Fórmula 9] o [Fórmula 10] en donde el anticuerpo representado por AB comprende un anticuerpo cualquiera seleccionado del grupo que consiste en los siguientes anticuerpos (a) a (g), o un fragmento funcional del anticuerpo, o una sal farmacológicamente aceptable del conjugado de anticuerpo y fármaco:

- (a) un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 69;
- (b) un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 73;
- (c) un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 77;
- (d) un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 65 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 69;
- (e) un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 65 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 73;
- (f) un anticuerpo que consiste en una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera mostrada en SEQ ID NO: 65 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada mostrada en SEQ ID NO: 77; y
- (g) un anticuerpo cualquiera seleccionado del grupo que consiste en los anticuerpos (a) a (f), en donde la cadena pesada o la cadena ligera comprende una o dos o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en modificaciones postraduccionales tipificadas por glucosilación ligada a N, glucosilación ligada a O, procesamiento N-terminal, procesamiento C-terminal, desamidación, isomerización de ácido aspártico, oxidación de metionina,

adición de un resto de metionina al extremo N, amidación de un resto de prolina y conversión de glutamina N-terminal o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico y una eliminación de uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo

5 4. Medicamento

Dado que el anticuerpo anti-CDH6 de la presente invención o el fragmento funcional del anticuerpo descrito en la sección anterior "2. Producción de anticuerpos anti-CDH6" y los Ejemplos se unen a CDH6 en la superficie de las células tumorales y tienen actividad de internalización, puede usarse como un medicamento y, en particular, como un agente terapéutico para el cáncer tal como el tumor de células renales o el tumor de ovario, por ejemplo, carcinoma de células renales, carcinoma renal de células claras, carcinoma de células renales papilares, cáncer de ovario, adenocarcinoma seroso de ovario, cáncer de tiroides, cáncer de las vías biliares, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón microcítico o cáncer de pulmón no microcítico), glioblastoma, mesotelioma, cáncer uterino, cáncer pancreático, tumor de Wilms o neuroblastoma, ya sea solo o en combinación con un fármaco adicional.

Adicionalmente, el anticuerpo anti-CDH6 de la presente invención o el fragmento funcional del anticuerpo puede usarse en la detección de células que expresan CDH6.

Por otra parte, dado que el anticuerpo anti-CDH6 de la presente invención o el fragmento funcional del anticuerpo tiene actividad de internalización, puede aplicarse como el anticuerpo en un conjugado de anticuerpo y fármaco.

Cuando se usa como el fármaco un fármaco que tiene actividad antitumoral tal como actividad citotóxica, el conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco de la presente invención descrito en la sección anterior "3. Conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco" y los Ejemplos es un conjugado del anticuerpo anti-CDH6 y/o el fragmento funcional del anticuerpo que tiene actividad de internalización y el fármaco que tiene actividad antitumoral tal como actividad citotóxica. Dado que este conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco exhibe actividad antitumoral contra las células cancerosas que expresan CDH6, puede usarse como un medicamento y, en particular, como un agente terapéutico y/o un agente profiláctico para el cáncer.

El conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco de la presente invención puede absorber humedad o tener agua de adsorción, por ejemplo, convertirse en hidrato cuando se deja en el aire o se somete a procedimientos de recristalización o purificación. La presente invención también incluye dicho compuesto o una sal farmacológicamente aceptable que contiene agua.

Cuando el conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco de la presente invención tiene un grupo básico tal como un grupo amino, puede formar una sal de adición de ácido farmacológicamente aceptable, si se desea. Los ejemplos de dicha sal de adición de ácido pueden incluir: hidrohaluros tales como fluorohidrato, clorhidrato, bromhidrato y yodhidrato; sales de ácidos inorgánicos tales como nitrato, perclorato, sulfato y fosfato; alcanosulfonatos inferiores tales como metanosulfonato, trifluorometanosulfonato y etanosulfonato; arilsulfonatos tales como bencenosulfonato y p-toluenosulfonato; sales de ácidos orgánicos tales como formiato, acetato, trifluoroacetato, malato, fumarato, succinato, citrato, tartrato, oxalato y maleato; y sales de aminoácidos tales como sal de ornitina, glutamato y aspartato.

Cuando el conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco de la presente invención tiene un grupo ácido tal como un grupo carboxi, puede formar una sal de adición de base farmacológicamente aceptable, si se desea. Los ejemplos de dicha sal de adición de base pueden incluir: sales de metales alcalinos tales como sal de sodio, sal de potasio y sal de litio; sales de metales alcalinotérreos tales como una sal de calcio y una sal de magnesio; sales inorgánicas tales como una sal de amonio; y sales de aminas orgánicas tales como una sal de dibencilamina, una sal de morfolina, una sal de éster alquílico de fenilglicina, una sal de etilendiamina, una sal de N-metilglucamina, una sal de dietilamina, una sal de trietilamina, una sal de ciclohexilamina, una sal de dicitlohexilamina, una sal de N,N'-dibencil-etilendiamina, una sal de dietanolamina, una sal de N-bencil-N-(2-feniletoxi)amina, una sal de piperazina, una sal de tetrametilamonio y una sal de tris(hidroximetil)aminometano.

La presente invención también puede incluir un conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco en el cual uno o más átomos que constituyen el conjugado de anticuerpo y fármaco se reemplazan con isótopos de los átomos. Existen dos tipos de isótopos: radioisótopos e isótopos estables. Los ejemplos del isótopo pueden incluir isotipos de hidrógeno (2H y 3H), isótopos de carbono (11C, 13C y 14C), isótopos de nitrógeno (13N y 15N), isótopos de oxígeno (15O, 17O y 18O) e isótopos de flúor (18F). Una composición que comprende el conjugado de anticuerpo y fármaco marcado con dicho isótopo es útil como, por ejemplo, un agente terapéutico, un agente profiláctico, un reactivo de investigación, un reactivo de ensayo, un agente de diagnóstico y un agente de formación de imágenes de diagnóstico *in vivo*. Todos y cada uno de los conjugados de anticuerpo y fármaco marcados con un isótopo y las mezclas de conjugados de anticuerpo y fármaco marcados con un isótopo en cualquier proporción dada se incluyen en la presente invención. El conjugado de anticuerpo y fármaco marcado con un isótopo puede producirse, por ejemplo, usando un material de partida marcado con un isótopo, en lugar de un material de partida para el método de producción de la presente invención mencionado más adelante, de acuerdo con un método conocido en la técnica.

La citotoxicidad *in vitro* puede medirse en función de la actividad de supresión de las respuestas proliferativas de las

células, por ejemplo. Por ejemplo, se cultiva una línea de células cancerosas que sobreexpresan CDH6 y se añade el conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco en diferentes concentraciones al sistema de cultivo. En lo sucesivo, su actividad supresora contra la formación de focos, la formación de colonias y el crecimiento de esferoides puede medirse. En este contexto, por ejemplo, mediante el uso de una línea celular de cáncer derivada de un tumor de células renales o de un tumor de ovario, puede examinarse la actividad de inhibición del crecimiento celular contra tumores de células renales o tumores ováricos.

Los efectos terapéuticos sobre el cáncer en un animal de experimentación pueden medirse *in vivo*, por ejemplo, administrando el conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco a un ratón desnudo en el que se ha inoculado una línea de células tumorales que expresan en gran medida CDH6, y a continuación midiendo un cambio en las células cancerosas. En este contexto, por ejemplo, mediante el uso de un modelo animal derivado de un ratón inmunodeficiente mediante la inoculación de células derivadas de carcinoma de células renales, de carcinoma renal de células claras, de carcinoma de células renales papilares, de cáncer de ovario, de adenocarcinoma seroso de ovario o de cáncer de tiroides, pueden medirse los efectos terapéuticos sobre carcinoma de células renales, carcinoma renal de células claras, carcinoma de células renales papilares, cáncer de ovario, adenocarcinoma seroso de ovario o cáncer de tiroides.

El tipo de cáncer al que se aplica el conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco de la presente invención no está particularmente limitado siempre que el cáncer exprese CDH6 en las células cancerosas a tratar. Los ejemplos de los mismos pueden incluir carcinoma de células renales (por ejemplo, carcinoma de células claras renales o carcinoma de células renales papilares), cáncer de ovario, adenocarcinoma seroso de ovario, cáncer de tiroides, cáncer de las vías biliares, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón microcítico o cáncer de pulmón no microcítico), glioblastoma, mesotelioma, cáncer uterino, cáncer pancreático, tumor de Wilms y neuroblastoma, aunque el cáncer no se limita a estos siempre que el cáncer exprese CDH6. Los ejemplos más preferidos de cáncer pueden incluir carcinoma de células renales (por ejemplo, carcinoma de células claras renales y carcinoma de células renales papilares) y cáncer de ovario.

El conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco de la presente invención puede administrarse preferentemente a un mamífero y más preferentemente a un ser humano.

Una sustancia usada en una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco de la presente invención puede seleccionarse apropiadamente entre aditivos farmacéuticos y otros usados habitualmente en este campo, en términos de la dosis aplicada o la concentración aplicada, y a continuación usarse.

El conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco de la presente invención puede administrarse como una composición farmacéutica que comprende uno o más componentes farmacéuticamente compatibles. Por ejemplo, la composición farmacéutica comprende normalmente uno o más vehículos farmacéuticos (por ejemplo, líquidos esterilizados (por ejemplo, agua y aceite (incluyendo aceite de petróleo y aceite de origen animal, origen vegetal o de origen sintético (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo))). El agua es un vehículo más típico cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Una solución salina acuosa, una solución acuosa de dextrosa y una solución acuosa de glicerol también pueden usarse como un vehículo líquido, en particular, para una solución inyectable. Se conocen en la técnica vehículos farmacéuticos adecuados. Si se desea, la composición también puede comprender una cantidad traza de un agente humectante, un agente emulsionante o un agente tamponante del pH. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se desvelan en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. La prescripción corresponde a un modo de administración.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar el conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco de la presente invención. Los ejemplos de la vía de administración pueden incluir, pero no se limitan a, vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea. La administración puede realizarse mediante inyección o inyección en embolada, por ejemplo. De acuerdo con una realización preferida específica, la administración del conjugado de anticuerpo y fármaco descrito anteriormente se realiza mediante inyección. La administración parenteral es la vía de administración preferida.

De acuerdo con una realización representativa, se prescribe la composición farmacéutica, como una composición farmacéutica adecuada para administración intravenosa a un ser humano, de acuerdo con procedimientos convencionales. La composición para administración intravenosa es normalmente una solución en una solución tampón acuosa isotónica y estéril. Si es necesario, el medicamento también puede contener un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar el dolor en el área de inyección (por ejemplo, lignocaína). En general, los ingredientes descritos anteriormente se proporcionan, ya sea por separado o juntos en una mezcla en forma farmacéutica unitaria, como un polvo secado por congelación o un concentrado anhidro contenido en un recipiente que se obtiene sellándolo, por ejemplo, una ampolla o un sobre que indica la cantidad del principio activo. Cuando el medicamento vaya a administrarse mediante inyección, puede administrarse usando, por ejemplo, un frasco de inyección que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando el medicamento vaya a administrarse mediante inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril o solución salina para inyección de tal manera que los ingredientes descritos anteriormente se mezclen entre sí antes de la administración.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que comprende únicamente el conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco de la presente solicitud, o puede ser una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco y al menos un agente terapéutico distinto para el cáncer. El conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco de la presente invención también puede administrarse junto con un agente terapéutico adicional para el cáncer, y puede de esta manera mejorar un efecto anticanceroso. El agente anticanceroso adicional usado para tal fin puede administrarse a un individuo, simultánea, separada o continuamente, junto con el conjugado de anticuerpo y fármaco. De otro modo, el agente anticanceroso adicional y el conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco pueden administrarse al sujeto en diferentes intervalos de administración. Los ejemplos de dicho agente terapéutico contra el cáncer pueden incluir inhibidores de la tirosina quinasa incluyendo imatinib, sunitinib y regorafenib, inhibidores de CDK4/6 incluyendo palbociclib, inhibidores de HSP90 incluyendo TAS-116, inhibidores de MEK incluyendo MEK162 e inhibidores de puntos de control inmunitario incluyendo nivolumab, pembrolizumab e ipilimumab, aunque el agente terapéutico contra el cáncer no se limita a esto siempre que el fármaco tenga actividad antitumoral.

Una composición farmacéutica tal puede prepararse como una formulación que tiene una composición seleccionada y una pureza necesaria en forma de una formulación liofilizada o una formulación líquida. La composición farmacéutica preparada como una formulación liofilizada puede ser una formulación que contenga un aditivo farmacéutico apropiado usado en este campo. De manera análoga, la formulación líquida puede prepararse de tal manera que contenga diversos aditivos farmacéuticos usados en este campo.

La composición y la concentración de la composición farmacéutica también varían dependiendo del método de administración. Con respecto a la afinidad del conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención por el antígeno, es decir, la constante de disociación (valor K_d) del conjugado de anticuerpo anti-CDH6 y fármaco con el antígeno, a medida que aumenta la afinidad (es decir, el valor K_d es bajo), la composición farmacéutica puede ejercer efectos medicinales, incluso si se reduce la dosis aplicada del mismo. En consecuencia, la dosis aplicada del conjugado de anticuerpo y fármaco también puede determinarse estableciendo la dosis aplicada en función del estado de la afinidad del conjugado de anticuerpo y fármaco por el antígeno. Cuando el conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención se administra a un ser humano, puede administrarse a una dosis de, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg una vez o una pluralidad de veces a intervalos de 1 a 180 días. Puede administrarse preferentemente a una dosis de 0,1 a 50 mg/kg y más preferentemente de 1 a 50 mg/kg, de 1 a 30 mg/kg, de 1 a 20 mg/kg, de 1 a 15 mg/kg, de 2 a 50 mg/kg, de 2 a 30 mg/kg, de 2 a 20 mg/kg o de 2 a 15 mg/kg varias veces a intervalos de 1 a 4 semanas, preferentemente de 2 a 3 semanas.

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá específicamente en los siguientes ejemplos. Debe tenerse en cuenta que, en los siguientes ejemplos, salvo que se indique lo contrario, se han llevado a cabo operaciones individuales de manipulación genética de acuerdo con el método descrito en "Molecular Cloning" (Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T., publicado por Cold Spring Harbor Laboratory Press en 1989) u otros métodos descritos en manuales experimentales usados por personas expertas en la materia, o cuando se han usado reactivos o kits disponibles en el mercado, los ejemplos se han llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones incluidas en los productos disponibles en el mercado. En la presente descripción, los reactivos, los disolventes y los materiales de partida están fácilmente disponibles de fuentes comerciales, salvo que se indique lo contrario.

[Ejemplo 1: Obtención de anticuerpos de rata anti-CDH6 humana con actividad de internalización]

1)-1 Construcción de vectores de expresión de CDH6 de ser humano, ratón, rata y macaco cangrejero

Usando un vector de expresión de ADNc que codifica la proteína CDH6 humana (NP_004923) (OriGene Technologies Inc., RC217889), el ADNc se incorporó a un vector para la expresión en mamíferos de acuerdo con un método conocido por una persona experta en la materia para producir el vector de expresión de CDH6 humana pcDNA3.1-hCDH6. La secuencia de aminoácidos del ORF (marco de lectura abierto) de CDH6 humana se muestra en SEQ ID NO: 1.

Usando un vector de expresión de ADNc que codifica la proteína CDH6 de ratón (NP_031692) (OriGene Technologies Inc., MC221619), el ADNc se incorporó a un vector para la expresión en mamíferos de acuerdo con un método conocido por una persona experta en la materia para producir los vectores de expresión de CDH6 de ratón pcDNA3.1-mCDH6 y p3xFLAG-CMV-9-mCDH6. La secuencia de aminoácidos del ORF de CDH6 de ratón se muestra en SEQ ID NO: 7.

Usando cada fracción de ADNc del vector de expresión de ADNc que codifica la proteína CDH6 de rata (NP_037059) (OriGene Technologies Inc., RN211850), el ADNc se incorporó a un vector para la expresión en mamíferos de acuerdo con un método conocido por una persona experta en la materia para producir los vectores de expresión de CDH6 de rata pcDNA3.1-rCDH6 y p3xFLAG-CMV-9-rCDH6. La secuencia de aminoácidos del ORF de CDH6 de rata se muestra en SEQ ID NO: 8.

El ADNc que codifica la proteína CDH6 de macaco cangrejero se clonó con ADNc sintetizado a partir del ARN total del riñón de macaco cangrejero como una plantilla usando el cebador 1 (5'-CACCATGAGAACTTACCGCTACTTCTTGCTGCTC-3') (SEQ ID NO: 85) y el cebador 2 (5'-TTAGGAGTCTTTGTCACTGTCCACTCCTCC-3') (SEQ ID NO: 86). Se confirmó que la secuencia obtenida correspondía a la región extracelular de CDH6 de macaco cangrejero (NCBI, XP_005556691.1). También se confirmó que la secuencia correspondía a la secuencia de longitud completa de CDH6 de macaco cangrejero (EHH54180.1) registrada en EMBL. El ADNc se incorporó a un vector para la expresión en mamíferos de acuerdo con un método conocido por una persona experta en la materia para producir el vector de expresión de CDH6 de macaco cangrejero pcDNA3.1-cynoCDH6. La secuencia de aminoácidos del ORF de CDH6 de macaco cangrejero se muestra en SEQ ID NO: 9.

Se usó el kit EndoFree Plasmid Giga (Qiagen N.V.) para la producción en masa del ADN plasmídico producido.

1)-2 Inmunización

Para la inmunización, se usaron ratas hembras WKY/lzm (Japan SLC, Inc.). En primer lugar, las extremidades inferiores de cada rata se pretrataron con hialuronidasa (Sigma-Aldrich Co. LLC) y, en lo sucesivo, el vector de expresión de CDH6 humana pcDNA3.1-hCDH6 producido en el Ejemplo 1)- 1 se inyectó por vía intramuscular en los mismos sitios. Posteriormente, empleando ECM830 (BTX), se llevó a cabo electroporación *in vivo* en los mismos sitios usando un electrodo de dos agujas. Aproximadamente una vez cada dos semanas, se repitió la misma electroporación *in vivo* y, en lo sucesivo, se recogieron los ganglios linfáticos o el bazo de la rata y a continuación se usaron en la producción de hibridomas.

1)-3 Producción de hibridomas

Las células de los ganglios linfáticos o las células del bazo se fusionaron con células de mieloma de ratón SP2/0-ag14 (ATCC, N.º CRL-1 581) de acuerdo con la fusión celular eléctrica, usando una unidad LF301 Cell Fusion (BEX Co., Ltd.) y las células se suspendieron después y se diluyeron con ClonaCell-HY Selection Medium D (StemCell Technologies Inc.) y después se cultivaron en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. Las colonias de hibridomas individuales que aparecieron en el medio de cultivo se recogieron como hibridomas monoclonales, después se suspendieron en ClonaCell-HY Selection Medium E (StemCell Technologies Inc.) y a continuación se cultivaron en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. Después de una proliferación moderada de células, se produjeron soluciones madre congeladas de células de hibridoma individuales, mientras que el sobrenadante del cultivo de hibridoma obtenido se usó para detectar hibridomas productores de anticuerpos anti-CDH6 humana.

1)-4 Detección de hibridomas productores de anticuerpos de acuerdo con el método Cell-ELISA

1)-4-1 Preparación de células que expresan genes de antígenos para su uso en Cell-ELISA

Se prepararon células 293α (una línea celular de expresión estable derivada de células HEK293 que expresan integrina αv e integrina β3) a 5×10^5 células/ml en medio DMEM suplementado con FBS al 10 %. De acuerdo con los procedimientos de transducción para el uso de Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), se introdujo ADN de pcDNA3.1-hCDH6 o pcDNA3.1-cynoCDH6 o pcDNA3.1 como un control negativo en las células 293α y las células se dispensaron en una cantidad de 100 μl/pocillo en una placa de 96 pocillos (Corning Inc.). En lo sucesivo, las células se cultivaron en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % en medio DMEM suplementado con FBS al 10 % durante 24 a 27 horas. Las células transfectadas obtenidas se usaron para Cell-ELISA en un estado adhesivo.

1)-4-2 Cell-ELISA

Se eliminó el sobrenadante de cultivo de las células 293α transfectadas con el vector de expresión preparado en el Ejemplo 1)-4-1, y a continuación se añadió el sobrenadante de cultivo de cada hibridoma a las células 293α transfectadas con pcDNA3.1-hCDH6 o pcDNA3.1-cynoCDH6 o pcDNA3.1. Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células de los pocillos se lavaron una vez con PBS (+) suplementado con FBS al 5 % y, en lo sucesivo, se añadió a los pocillos el anticuerpo anti-IgG-peroxidasa de rata producido en conejo (Sigma-Aldrich Co. LLC) que se había diluido 500 veces con PBS (+) suplementado con FBS al 5 %. Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células de los pocillos se lavaron tres veces con PBS (+) suplementado con FBS al 5 %, en lo sucesivo, solución colorante OPD (que se había preparado disolviendo diclorhidrato de o-fenilendiamina (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y H₂O₂ en una solución de OPD (citrato trisódico 0,05 M, hidrógeno fosfato disódico 0,1 M 12-agua; pH 4,5), de tal manera que las sustancias pasaron a ser 0,4 mg/ml y 0,6 % (v/v), respectivamente, se añadió en una cantidad de 100 μl/pocillo a los pocillos. Se llevó a cabo una reacción de coloración con agitación ocasional. En lo sucesivo, se añadió HCl 1 M a la placa (100 μl/pocillo) para finalizar la reacción de coloración, seguido de la medición de la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas (ENVISION: PerkinElmer, Inc.). Los hibridomas que produjeron un sobrenadante de cultivo que exhibió una absorbancia mayor en las células 293α transfectadas con el vector de expresión pcDNA3.1-hCDH6 o pcDNA3.1-cynoCDH6 que en las células 293α transfectadas con el control pcDNA3.1 se seleccionaron como hibridomas productores de anticuerpos que se unen a CDH6 humana y CDH6 de

macaco cangrejero.

1)-5 Detección selectiva de la unión de anticuerpos al CDH6 de macaco cangrejero de acuerdo con citometría de flujo

5 1)-5-1 Preparación de células que expresan genes de antígenos para su uso en análisis de citometría de flujo

Las células 293T se sembraron en un matraz de 225 cm² (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) a 5×10^4 células/cm² y las células se cultivaron a continuación durante la noche en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % en medio DMEM suplementado con FBS al 10 %. pcDNA3.1-cynoCDH6 o pcDNA3.1 como un control negativo se introdujeron en las células 293T usando Lipofectamine 2000 y las células se cultivaron adicionalmente durante la noche en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. Las células 293T transfectadas con cada vector se trataron con TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific Corp.) y se lavaron con DMEM suplementado con FBS al 10 % y a continuación se suspendieron en PBS suplementado con FBS al 5 %. La suspensión celular obtenida se usó en el análisis de citometría de flujo.

15 1)-5-2 Análisis de citometría de flujo

La especificidad de unión al CDH6 de macaco cangrejero de un anticuerpo producido a partir de los hibridomas productores de anticuerpos de unión a CDH6 humana y CDH6 de macaco cangrejero que se habían seleccionado por Cell-ELISA en el Ejemplo 1)-4 se confirmó además por citometría de flujo. La suspensión de células 293T de expresión transitoria preparada en el Ejemplo 1)-5-1 se centrifugó y a continuación se eliminó el sobrenadante. En lo sucesivo, las células se suspendieron mediante la adición del sobrenadante de cultivo de cada hibridoma. Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 % y, en lo sucesivo, las células se suspendieron mediante la adición de conjugado FITC anti-IgG de rata (Sigma-Aldrich Co. LLC) que se había diluido 500 veces con PBS suplementado con FBS al 5 %. Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 % y a continuación se resuspendieron en PBS suplementado con FBS al 5 % y 2 µg/ml de 7-aminoactinomicina D (Molecular Probes, Inc.), seguido de detección mediante un citómetro de flujo (FC500; Beckman Coulter, Inc.). Los datos se analizaron usando FlowJo (Tree Star, Inc.). Después de que las células muertas se eliminaron del análisis excluyendo las células positivas para 7-aminoactinomicina D, se generó un histograma de la intensidad de fluorescencia FITC de células vivas. Los hibridomas que producen anticuerpos que se unen específicamente a CDH6 de macaco cangrejero expresada en la superficie de la membrana celular se seleccionaron basándose en resultados en que el histograma del anticuerpo se desplazó hacia el lado de fuerte intensidad de fluorescencia en las células 293T transfectadas con pcDNA3.1-cynoCDH6 en comparación con las células 293T transfectadas con el pcDNA3.1 control.

35 1)-6 Determinación del isotipo del anticuerpo monoclonal de rata

Se sugirió que los clones rG019, rG055, rG056 y rG061 se unen específica y fuertemente a CDH6 humana y CDH6 de mono entre los hibridomas productores de anticuerpos anti-CDH6 de rata seleccionados en el Ejemplo 1)-5, y se identificó el isotipo de cada anticuerpo. La subclase de cadena pesada y el tipo de cadena ligera del anticuerpo se determinaron usando un kit RAT MONOCLONAL ANTIBODY ISOTYPING TEST (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.). Como resultado, se confirmó que todos de estos 4 clones rG019, rG055, rG056 y rG061 tenían una cadena pesada de subclase IgG2b y una cadena ligera de tipo cadena κ.

45 1)-7 Preparación de anticuerpo de rata anti-CDH6 humana

1)-7-1 Producción de sobrenadante de cultivo

Los anticuerpos monoclonales de rata anti-CDH6 humana se purificaron a partir de los sobrenadantes del cultivo de hibridomas. En primer lugar, el volumen de cada hibridoma productor de anticuerpos monoclonales de rata anti-CDH6 se aumentó suficientemente con ClonaCell-HY Selection Medium E (StemCell Technologies Inc.) y, en lo sucesivo, el medio se intercambió con Hibridoma SFM (Thermo Fisher Scientific Corp.) al que se le había añadido el 20 % de Ultra Low IgG FBS (Thermo Fisher Scientific Corp.). En lo sucesivo, el hibridoma se cultivó durante 4 a 5 días. El sobrenadante del cultivo resultante se recogió y se eliminó la materia insoluble del mismo pasándolo a través de un filtro de 0,8 µm y de un filtro de 0,2 µm.

1)-7-2 Purificación de anticuerpo de rata anti-CDH6

Un anticuerpo (anticuerpo de rata anti-CDH6 (rG019, rG055, rG056 o rG061)) se purificó a partir del sobrenadante de cultivo de hibridomas preparados en el Ejemplo 1)-7-1 de acuerdo con la cromatografía de afinidad de proteína G. El anticuerpo se adsorbió en una columna de proteína G (GE Healthcare Biosciences Corp.), a continuación la columna se lavó con PBS y a continuación se eluyó el anticuerpo con una solución acuosa de glicina/HCl 0,1 M (pH 2,7). Se añadió Tris-HCl 1 M (pH 9,0) al eluato, de tal manera que el pH se ajustó a pH 7,0 a 7,5. En lo sucesivo, usando el dispositivo de filtro UF centrífugo VIVASPIN20 (corte de peso molecular: UF30K, Sartorius Inc.), el tampón se reemplazó con HBSor (histidina 25 mM/sorbitol al 5 %, pH 6,0), mientras que el anticuerpo se concentró, de tal manera que la concentración del anticuerpo se ajustó a 1 mg/ml. Finalmente, el anticuerpo se filtró a través de un filtro Minisart-Plus (Sartorius Inc.) para obtener una muestra purificada.

[Ejemplo 2: Evaluación *in vitro* del anticuerpo de rata anti-CDH6]

2)-1 Evaluación de la capacidad de unión del anticuerpo de rata anti-CDH6 mediante citometría de flujo

La actividad de unión a CDH6 humano del anticuerpo de rata anti-CDH6 producido en el Ejemplo 1)-7 se evaluó mediante citometría de flujo. Usando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), pcDNA3.1-hCDH6 producido en el Ejemplo 1)-1 se introdujo transitoriamente en células 293T (ATCC). Las células se cultivaron durante la noche en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % y, en lo sucesivo, se preparó una suspensión celular. La suspensión de las células 293T transfectadas se centrifugó y a continuación se eliminó el sobrenadante. En lo sucesivo, las células se suspendieron mediante la adición de cada uno de los 4 anticuerpos monoclonales de rata anti-CDH6 (clones N.º: rG019, rG055, rG056 y rG061), que se habían preparado en el Ejemplo 1)-7, o control de IgG de rata (R&D Systems, Inc.) (concentración final: 10 ng/ml). Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 % y a continuación se suspendieron mediante la adición de anticuerpo Anti-IgG de rata (molécula completa)-FITC producido en conejo (Sigma-Aldrich Co. LLC) que se había diluido 50 veces con PBS suplementado con FBS al 5 %. Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 %, seguido de detección mediante un citómetro de flujo (FC500; Beckman Coulter, Inc.). Los datos se analizaron usando FlowJo (Tree Star, Inc.). Los resultados se muestran en la Figura 1. En el histograma de la Figura 1, la abscisa representa la intensidad de fluorescencia de FITC, que indica la cantidad de anticuerpo unido, y la ordenada representa un recuento celular. El histograma sombreado muestra que se usaron células 293T de control negativo no transfectadas con hCDH6 y el histograma de línea sólida abierta muestra que se usaron células 293T transfectadas con hCDH6. Como se ve, la intensidad de la fluorescencia se mejoró mediante la unión del anticuerpo a hCDH6 en la superficie celular. El control de IgG de rata no se une a ninguna de las células. Como resultado, se confirmó que los 4 anticuerpos monoclonales de rata anti-CDH6 producidos se unen a las células 293T transfectadas con pcDNA3.1-hCDH6.

2)-2 Análisis del sitio de unión de CDH6 del anticuerpo de rata anti-CDH6 mediante citometría de flujo

2)-2-1 Construcción del vector de expresión para cada mutante de eliminación de dominio de CDH6 humana

La región extracelular de longitud completa de CDH6 humana tiene cinco dominios extracelulares, EC1 (SEQ ID NO: 2), EC2 (SEQ ID NO: 3), EC3 (SEQ ID NO: 4), EC4 (SEQ ID NO: 5) y EC5 (SEQ ID NO: 6). GeneArt sintetizó un gen que debe expresarse de manera que cada uno de los cinco dominios EC pueda eliminarse de CDH6 humana de longitud completa y lo incorporó a vectores p3xFLAG-CMV-9 para expresión en mamíferos (Sigma-Aldrich Co. LLC) de acuerdo con un método conocido por una persona experta en la materia para producir un vector de expresión para cada mutante de eliminación de dominio que carezca de uno cualquiera de EC1 a EC5.

2)-2-2 Análisis de epítomos del anticuerpo de rata anti-CDH6 mediante citometría de flujo usando un mutante con eliminación de dominio

Los epítomos a los que se unieron los anticuerpos de rata anti-CDH6 humana se identificaron mediante análisis de citometría de flujo usando una línea celular 293α transfectada con cada vector de eliminación del dominio EC. Usando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), cada vector de expresión mutante de eliminación de dominio producido en el Ejemplo 2)-2-1, o pcDNA3.1-hCDH6 para la expresión de CDH6 humana de longitud completa se introdujo transitoriamente en una línea celular 293α, que era una línea celular derivada de células HEK293 mediante transfección estable con vectores de expresión de integrina αv e integrina β3. Las células se cultivaron durante la noche en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % y, en lo sucesivo, se preparó una suspensión celular. La suspensión de las células 293α transfectadas se centrifugó y a continuación se eliminó un sobrenadante. En lo sucesivo, las células se suspendieron mediante la adición de cada uno de los 4 anticuerpos monoclonales de rata anti-CDH6 (clones N.º: rG019, rG055, rG056 y rG061), que se habían preparado en el Ejemplo 1)-7, o control de IgG de rata (R&D Systems, Inc.) (concentración final: 20 nM). Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 % y a continuación se suspendieron mediante la adición de anticuerpo Anti-IgG de rata (molécula completa)-FITC producido en conejo (Sigma-Aldrich Co. LLC) que se había diluido 50 veces con PBS suplementado con FBS al 5 %. Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 %, seguido de detección usando un citómetro de flujo (Canto II; BD Biosciences). Los datos se analizaron usando FlowJo (Tree Star, Inc.). Los resultados se muestran en las Figuras 2-1 a 2-6. En los histogramas de las Figuras 2-1 a 2-6, la abscisa representa la intensidad de fluorescencia de FITC, que indica la cantidad de anticuerpo unido, y la ordenada representa el recuento celular. El histograma sombreado muestra que se usaron células 293α no transfectadas de control negativo y el histograma de línea sólida abierta muestra que se usaron células 293 que expresan hCDH6 de longitud completa o cada mutante de eliminación del dominio EC. La intensidad de la fluorescencia aumenta cuando el anticuerpo se une al hCDH6 de longitud completa o a cada mutante de eliminación del dominio EC en la superficie de las células. El control de IgG de rata no se une a ninguna de las células transfectadas. Los 4 anticuerpos monoclonales anti-CDH6 de rata producidos se unen al hCDH6 de longitud completa, el mutante de eliminación de EC1, el mutante de eliminación de EC2, el mutante de eliminación de EC4 y el mutante de eliminación de EC5, pero no se unen al mutante de eliminación de EC3. A partir de este resultado, se demostró que los 4 anticuerpos monoclonales de rata anti-CDH6 se unen específicamente a

hCDH6 con EC3 como un epítipo.

2)-3 Actividad de internalización del anticuerpo de rata anti-CDH6

5 2)-3-1 Confirmación de la expresión de CDH6 en la línea de células tumorales humanas

Con el fin de seleccionar una línea de células tumorales humanas CDH6-positivas para su uso en la evaluación de los anticuerpos obtenidos, la información de expresión de CDH6 se recuperó de una base de datos conocida y se evaluó la expresión de CDH6 sobre la superficie de la membrana celular mediante citometría de flujo. Las líneas celulares de tumores ováricos humanos NIH:OVCAR-3, PA-1 y ES-2 y la línea celular de tumor de células renales humanas 786-0 (todas obtenidas de ATCC) se cultivaron cada una en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % y, en lo sucesivo, se preparó una suspensión celular. Las células se centrifugaron y a continuación se eliminó el sobrenadante. En lo sucesivo, las células se suspendieron mediante la adición de un anticuerpo anti-CDH6 humana disponible en el mercado (MABU2715, R&D Systems, Inc.) o IgG1 de ratón (BD Pharmingen) como un control negativo (concentración final: 50 µg/ml). Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 % y a continuación se suspendieron mediante la adición de fragmento F(ab')₂ de inmunoglobulinas de cabra anti-ratón conjugadas con FITC (Dako) que se habían diluido 50 veces con PBS suplementado con FBS al 5 %. Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 %, seguido de detección usando un citómetro de flujo (Canto II; BD Biosciences). Los datos se analizaron usando FlowJo (Tree Star, Inc.). Los resultados se muestran en la Figura 3. En el histograma de la Figura 3, la abscisa representa la intensidad de fluorescencia de FITC, que indica la cantidad de anticuerpo unido, y la ordenada representa el recuento celular. El histograma sombreado muestra que se usó el control negativo mIgG1 en la tinción, y el histograma de línea sólida abierta muestra que se usó el anticuerpo anti-CDH6 humana en la tinción. Como se ve, la intensidad de la fluorescencia se mejoró mediante la unión del anticuerpo a hCDH6 en la superficie de las células. El control de mIgG1 no se une a ninguna de las células. Como resultado, se confirmó que las líneas celulares NIH:OVCAR-3, PA-1 y 786-O expresan endógenamente CDH6 en la superficie celular. Por otro lado, se demostró que la línea celular ES-2 no expresa CDH6.

30 2)-3-2 Evaluación de la actividad de internalización del anticuerpo de rata anti-CDH6

La actividad de internalización de los anticuerpos de rata anti-CDH6 se evaluó usando un reactivo anti-IgG de rata ZAP de rata (Advanced Targeting Systems) conjugado con una toxina (saporina) que inhibe la síntesis de proteínas. Específicamente, la línea celular de tumor de ovario positiva para CDH6 humana NIH:OVCAR-3 (ATCC) se sembró a 4×10^3 células/pocillo sobre una placa de 96 pocillos y después se cultivó durante la noche en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. La línea de células tumorales renales humanas positivas para CDH6 786-O (ATCC) se sembró a 1×10^3 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y a continuación se cultivó durante la noche. El día siguiente, cada anticuerpo de rata anti-CDH6 (concentración final: 1 nM) o anticuerpo IgG2b de rata (R&D Systems, Inc.) como un anticuerpo de control negativo se añadió a la placa. Zap de rata (concentración final: 0,5 nM) o IgG de cabra anti-rata, Fragmento específico Fc (gamma) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) no conjugado con la toxina (concentración final: 0,5 nM) como un control negativo se añadió además a la placa y las células se cultivaron en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % durante 3 días. El número de células vivas se midió mediante la cuantificación de la actividad de ATP (ULR) usando un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo(TM) (Promega Corp.). En esta evaluación, Zap de rata se capta por las células de una manera que depende de la actividad de internalización del anticuerpo de rata anti-CDH6, de tal manera que la saporina que inhibe la síntesis de proteínas se libere en las células, con el fin de suprimir el crecimiento celular. Un efecto de inhibición del crecimiento celular producido por la adición del anticuerpo anti-CDH6 se indicó mediante una tasa de supervivencia relativa cuando el número de células vivas en un pocillo suplementado con el control negativo en lugar de Zap de rata se definió como el 100 %. La Figura 4 muestra un gráfico y una tabla de la tasa de supervivencia celular. Como resultado, se demostró que los anticuerpos de rata anti-CDH6 se unen a CDH6 y provocan internalización.

[Ejemplo 3: Determinación de la secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable del anticuerpo de rata anti-CDH6]

55 3)-1 Amplificación y secuenciación de fragmentos de genes de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera de rG019

3)-1-1 Preparación de ARN total a partir de G019

Para amplificar el ADNc que codifica cada región variable de rG019, el ARN total se preparó a partir de G019 usando el reactivo TRIzol (Ambion, Inc.).

3)-1-2 Amplificación del ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada de rG019 mediante PCR 5'-RACE y determinación de la secuencia de nucleótidos

El ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada se amplificó usando aproximadamente 1 µg del ARN total preparado en el Ejemplo 3)-1-1 y un kit de amplificación de ADNc SMARTer RACE (Clontech Laboratories, Inc.). Como

cebadores usados para amplificar el ADNc de la región variable del gen de la cadena pesada de rG019 de acuerdo con PCR, se usaron UPM (Universal Primer A Mix: incluido con el kit de amplificación de ADNc SMARTer RACE) y cebadores diseñados a partir de las secuencias de las regiones constantes de cadenas pesadas de rata conocidas.

5 El ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada amplificado por PCR 5'-RACE se clonó en un plásmido y, en lo sucesivo, la secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de la cadena pesada fue sometida a análisis de secuencia.

10 La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de rG019 se muestra en SEQ ID NO: 16, y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 15.

3)-1-3 Amplificación del ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera de rG019 mediante PCR 5'-RACE y determinación de la secuencia de nucleótidos

15 La amplificación y la secuenciación se llevaron a cabo mediante el mismo método que el aplicado en el Ejemplo 3)-1-2. Sin embargo, como cebadores usados para amplificar el ADNc de la región variable del gen de la cadena ligera de rG019 de acuerdo con PCR, se usaron UPM (Universal Primer A Mix: incluido con el kit de amplificación de ADNc SMARTer RACE) y cebadores diseñados a partir de las secuencias de las regiones constantes de cadenas ligeras de rata conocidas.

20 La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de rG019 se muestra en SEQ ID NO: 11, y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 10.

25 3)-2 Amplificación y secuenciación de fragmentos de genes de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera de rG055

Las secuencias se determinaron mediante el mismo método que el aplicado en el Ejemplo 3)-1.

30 La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de rG055 se muestra en SEQ ID NO: 26, y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 25. La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de rG055 se muestra en SEQ ID NO: 21, y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 20.

35 3)-3 Amplificación y secuenciación de fragmentos de genes de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera de rG056

Las secuencias se determinaron mediante el mismo método que el aplicado en el Ejemplo 3)-1.

40 La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de rG056 se muestra en SEQ ID NO: 36, y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 35. La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de rG056 se muestra en SEQ ID NO: 31, y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 30.

45 3)-4 Amplificación y secuenciación de fragmentos de genes de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera de rG061

Las secuencias se determinaron mediante el mismo método que el aplicado en el Ejemplo 3)-1.

50 La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de cadena pesada de rG061 se muestra en SEQ ID NO: 46, y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 45. La secuencia de nucleótidos del ADNc que codifica la región variable de cadena ligera de rG061 se muestra en SEQ ID NO: 41, y la secuencia de aminoácidos del mismo se muestra en SEQ ID NO: 40.

[Ejemplo 4: Producción del anticuerpo anti-CDH6 quimérico humano chG019]

55

4)-1 Construcción del vector de expresión del anticuerpo anti-CDH6 quimérico humano chG019

4)-1-1 Construcción del vector de expresión de cadena ligera quimérico y humanizado pCMA-LK

60 Un fragmento de aproximadamente 5,4 kb, que se había obtenido mediante la digestión del plásmido pcDNA3.3-TOPO/LacZ (Invitrogen Corp.) con las enzimas de restricción XbaI y PmeI, se unió a un fragmento de ADN que comprendía una secuencia de ADN (SEQ ID NO: 50) que codificaba una secuencia señal de cadena ligera humana y una región constante de cadena κ humana, usando un kit de clonación PCR In-Fusion Advantage (Clontech Laboratories, Inc.), para producir pcDNA3.3/LK.

65

Se eliminó una unidad de expresión de neomicina de pcDNA3.3/LK para construir pCMA-LK.

4)-1-2 Construcción del vector de expresión de cadena pesada de tipo IgG1 quimérico y humanizado pCMA-G1

Un fragmento de ADN, que se había obtenido mediante la digestión de pCMA-LK con XbaI y PmeI para eliminar de la misma la secuencia de ADN que codifica la secuencia señal de la cadena ligera y la región constante de la cadena κ humana, se unió a un fragmento de ADN que comprendía una secuencia de ADN (SEQ ID NO: 51) que codificaba una secuencia señal de cadena pesada humana y una región constante de IgG1 humana, usando un kit de clonación PCR In-Fusion Advantage (Clontech Laboratories, Inc.), para construir pCMA-G1.

4)-1-3 Construcción del vector de expresión de la cadena pesada de chG019

Se sintetizó un fragmento de ADN de las posiciones de nucleótidos 36 a 440 en la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de chG019 mostrada en SEQ ID NO: 57 (GENEART). Usando un kit de clonación PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.), el fragmento de ADN sintetizado se insertó en un sitio de pCMA-G1 que se había sido escindido con la enzima de restricción BlnI, para construir un vector de expresión de cadena pesada de chG019. Debe tenerse en cuenta que, para la cadena pesada de chG019, se usó una secuencia de CDR con cisteína sustituida con prolina para evitar enlaces disulfuro impredecibles.

4)-1-4 Construcción del vector de expresión de la cadena ligera de chG019

Se sintetizó un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN (SEQ ID NO: 52) que codifica la cadena ligera de chG019 (GENEART). Usando un kit de clonación PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.), el fragmento de ADN sintetizado se unió a un fragmento de ADN, que se había obtenido mediante la digestión de pCMA-LK con XbaI y PmeI para eliminar de la misma la secuencia de ADN que codifica la secuencia señal de la cadena ligera y la región constante de la cadena κ humana, para construir un vector de expresión de la cadena ligera de chG019.

4)-2 Producción y purificación del anticuerpo anti-CDH6 quimérico humano chG019

4)-2-1 Producción de chG019

De acuerdo con el manual, se cultivaron y se pasaron células FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.). $1,2 \times 10^9$ células FreeStyle 293F (Invitrogen Corp.) en la fase de crecimiento logarítmico se sembraron en un matraz Erlenmeyer Fernbach de 3 l (Corning Inc.), a continuación se diluyó con medio de expresión FreeStyle 293 (Invitrogen Corp.) a $2,0 \times 10^6$ células/ml. A 40 ml de medio Opti-Pro SFM (Invitrogen Corp.), se añadieron 0,24 mg del vector de expresión de cadena pesada, 0,36 mg del vector de expresión de cadena ligera y 1,8 mg de polietilenimina (Polyscience N.º 24765) y la mezcla obtenida se agitó suavemente. Después de incubación durante 5 minutos, la mezcla se añadió a las células FreeStyle 293F. Las células se cultivaron en agitación a 90 rpm en una incubadora de CO₂ al 8 % a 37 °C durante 4 horas y, en lo sucesivo, se añadieron al cultivo 600 ml de medio EX-CELL VPRO (SAFC Biosciences Inc.), 18 ml de GlutaMAX I (GIBCO) y 30 ml de Yeastolate Ultrafiltrate (GIBCO). Las células se cultivaron además en agitación a 90 rpm en una incubadora de CO₂ al 8 % a 37 °C durante 7 días. El sobrenadante de cultivo obtenido se filtró a través de un filtro de cápsula desechable (Advantec N.º CCS-045-E1H).

4)-2-2 Purificación de chG019

Se purificó un anticuerpo a partir del sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 4)-2-1 mediante un proceso de una sola etapa de acuerdo con la cromatografía de afinidad de proteína A. El sobrenadante del cultivo se aplicó a una columna que se había llenado con MabSelectSuRe (GE Healthcare Biosciences Corp.) equilibrada con PBS y, en lo sucesivo, la columna se lavó con PBS en una cantidad de dos o más veces el volumen de la columna. Posteriormente, el anticuerpo se eluyó con una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4,0), de tal manera que se recogió una fracción que contenía un anticuerpo. La fracción se dializó (Thermo Fisher Scientific Inc., Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette), de tal manera que el tampón se reemplazó con HBSor (histidina 25 mM/sorbitol al 5 %, pH 6,0). Usando un dispositivo de filtro UF centrífugo VIVASPIN20 (corte de peso molecular: UF10K, Sartorius Inc.), el anticuerpo se concentró, de tal manera que la concentración de IgG se ajustó a 5 mg/ml o más. Finalmente, el anticuerpo se filtró a través de un filtro Minisart-Plus (Sartorius Inc.) para obtener una muestra purificada.

4)-3 Evaluación de la actividad de unión del anticuerpo anti-CDH6 quimérico humano chG019

La actividad de unión a CDH6 del anticuerpo anti-CDH6 quimérico humano chG019 purificado en 4)-2 se confirmó mediante citometría de flujo. Usando Lipofectamine 2000, pcDNA3.1-hCDH6 o pcDNA3.1-cynoCDH6 producidos en el Ejemplo 1)-1, o pcDNA3.1 se introdujeron transitoriamente en células 293a. Las células se cultivaron durante la noche en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % y, en lo sucesivo, se preparó una suspensión celular. Se añadió chG019 a la suspensión de cada una de estas células. Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. En lo sucesivo, las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 % y a continuación se suspendieron mediante la adición de fragmento F(ab')₂ anti-IgG humana marcado con PE, anticuerpo Fcy (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) que se había diluido 500 veces con PBS suplementado con FBS al 5 %. Las células se dejaron

reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 % y a continuación se resuspendieron en PBS suplementado con FBS al 5 %, seguido de detección usando un citómetro de flujo (Canto II; BD Biosciences). Los datos se analizaron usando FlowJo (Tree Star, Inc.). Como se muestra en la Figura 5, chG019 no se unió a las células 293α transfectadas con pcDNA3.1 como un control negativo, pero se unió a las células 293α transfectadas con pcDNA3.1-hCDH6 o pcDNA3.1-cynoCDH6 de una manera dependiente de la concentración de anticuerpos. En la Figura 5, la abscisa representa la concentración de anticuerpos y la ordenada representa la cantidad del anticuerpo unido, basado en la intensidad de fluorescencia media. Es evidente a partir de este resultado que chG019 se une específicamente a CDH6 humana y a CDH6 de macaco cangrejero con una actividad de unión casi equivalente.

[Ejemplo 5: Producción de anticuerpos anti-CDH6 humanizados]

5)-1 Diseño de la forma humanizada del anticuerpo anti-CDH6

5)-1-1 Modelado molecular de la región variable de chG019

El modelado molecular de las regiones variables de chG019 explotó un método conocido como modelado de homología (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Se empleó el programa de análisis de estructura tridimensional de proteínas disponible en el mercado BioLuminate (fabricado por Schrodinger, LLC) usando, como un molde, una estructura (PDB ID: 2I9L) registrada en Protein Data Bank (Nuc. Acid Res. 35, D301-D303 (2007)) con una alta identidad de secuencia con las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de chG019.

5)-1-2 Diseño de la secuencia de aminoácidos del hG019 humanizado

chG019 fue humanizado mediante injerto de CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Las secuencias consenso del subgrupo 1 de la cadena gamma humana y del subgrupo 1 de la cadena kappa determinadas por KABAT *et al.* (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed. Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) tenían una alta identidad con las regiones marco de chG019 y, en base a esto, se seleccionaron como aceptores de la cadena pesada y de la cadena ligera, respectivamente. Los restos donantes que se injertarían sobre los aceptores se seleccionaron analizando modelos tridimensionales con referencia a, por ejemplo, los criterios dados por Queen *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)).

5)-2 Humanización de la cadena pesada de chG019

Las tres cadenas pesadas diseñadas de esta manera se denominaron hH01, hH02 y hH04. La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada hH01 se muestra en SEQ ID NO: 69. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 69 se muestra en SEQ ID NO: 70. La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada hH02 se muestra en SEQ ID NO: 73. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73 se muestra en SEQ ID NO: 74. La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada hH04 se muestra en SEQ ID NO: 77. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 77 se muestra en SEQ ID NO: 78.

5)-3 Humanización de la cadena ligera de chG019

Las dos cadenas ligeras diseñadas de esta manera se denominaron hL02 y hL03. La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera hL02 se muestra en SEQ ID NO: 61. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 se muestra en SEQ ID NO: 62. La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera hL03 se muestra en SEQ ID NO: 65. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 se muestra en SEQ ID NO: 66.

5)-4 Diseño de hG019 humanizado mediante combinación de cadena pesada y cadena ligera

Un anticuerpo que consiste en hH01 y hL02 se denominó "anticuerpo H01L02" o "H01L02". Un anticuerpo que consiste en hH02 y hL02 se denominó "anticuerpo H02L02" o "H02L02". Un anticuerpo que consiste en hH02 y hL03 se denominó "anticuerpo H02L03" o "H02L03". Un anticuerpo que consiste en hH04 y hL02 se denominó "anticuerpo H04L02" o "H04L02".

5)-5 Expresión del anticuerpo anti-CDH6 humanizado

5)-5-1 Construcción del vector de expresión de la cadena pesada de hG019 humanizado

5)-5-1-1 Construcción del vector de expresión de la cadena pesada tipo hG019-H01 humanizada

Se sintetizó un fragmento de ADN de las posiciones de nucleótidos 36 a 440 en la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada tipo hG019-H01 humanizada mostrada en SEQ ID NO: 70 (GENEART). Se construyó un vector de expresión de cadena pesada de tipo hG019-H01 humanizada mediante el mismo método que el aplicado en el Ejemplo

4)-1-3.

5)-5-1-2 Construcción del vector de expresión de la cadena pesada tipo hG019-H02 humanizada

5 Se sintetizó un fragmento de ADN de las posiciones de nucleótidos 36 a 440 en la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada tipo hG019-H02 humanizada mostrada en SEQ ID NO: 74 (GENEART). Se construyó un vector de expresión de cadena pesada de tipo hG019-H02 humanizada mediante el mismo método que el aplicado en el Ejemplo 4)-1-3.

10 5)-5-1-3 Construcción del vector de expresión de la cadena pesada tipo hG019-H04 humanizada

Se sintetizó un fragmento de ADN de las posiciones de nucleótidos 36 a 440 en la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada tipo hG019-H04 humanizada mostrada en SEQ ID NO: 78 (GENEART). Se construyó un vector de expresión de cadena pesada de tipo hG019-H04 humanizada mediante el mismo método que el aplicado en el Ejemplo 4)-1-3.

5)-5-2 Construcción del vector de expresión de la cadena ligera de hG019 humanizado

5)-5-2-1 Construcción del vector de expresión de la cadena ligera tipo hG019-L02 humanizada

20 Se sintetizó un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica la región variable de la cadena ligera de tipo hG019-L02 humanizada de las posiciones de nucleótidos 37 a 399 en la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo hG019-L02 humanizada mostrada en SEQ ID NO: 62 (GENEART). Usando un kit de clonación PCR In-Fusion HD (Clontech Laboratories, Inc.), el fragmento de ADN sintetizado se insertó en un sitio de pCMA-LK que se había sido escindido con la enzima de restricción BsiWI, de tal manera que se construya un vector de expresión de cadena ligera tipo hG019-L02 humanizada.

5)-5-2-2 Construcción del vector de expresión de la cadena ligera tipo hG019-L03 humanizada

30 Se sintetizó un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica la región variable de la cadena ligera de tipo hG019-L03 humanizada de las posiciones de nucleótidos 37 a 399 en la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo hG019-L03 humanizada mostrada en SEQ ID NO: 66 (GENEART). Se construyó un vector de expresión de cadena ligera de tipo hG019-L03 humanizada mediante el mismo método que el aplicado en el Ejemplo 5)-5-2-1.

5)-5-3 Preparación de hG019 humanizado

5)-5-3-1 Producción de H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02

40 Los anticuerpos se produjeron mediante el mismo método que el aplicado en el Ejemplo 4)-2-1. H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02 se produjeron mediante la combinación de la cadena pesada y la cadena ligera mostradas en el Ejemplo 5)-4.

5)-5-3-2 Purificación en dos etapas de H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02

45 El anticuerpo se purificó a partir del sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 5)-5-3-1, mediante un proceso de dos etapas, en concreto, por cromatografía de afinidad de proteína A e hidroxapatita cerámica. El sobrenadante del cultivo se aplicó a una columna que se había llenado con MabSelectSuRe (fabricada por GE Healthcare Biosciences Corp.) equilibrada con PBS y, en lo sucesivo, la columna se lavó con PBS en una cantidad de dos o más veces el volumen de la columna. Posteriormente, el anticuerpo se eluyó usando una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4,0). Se dializó una fracción que contenía el anticuerpo (Thermo Fisher Scientific Inc., Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette), de tal manera que el tampón se reemplazó por PBS. La solución de anticuerpos se diluyó 5 veces con un tampón de fosfato de sodio 5 mM/MES 50 mM/pH 7,0 y a continuación se aplicó a una columna de hidroxapatita cerámica (Bio-Rad Laboratories, Inc., Columna de hidroxapatita tipo 1 Bio-Scale CHT) que se había equilibrado con un tampón NaPi 5 mM/MES 50 mM/NaCl 30 mM/pH 7,0. La elución se llevó a cabo en un gradiente de concentración lineal de cloruro sódico, de tal manera que se recogió una fracción que contenía un anticuerpo. Esta fracción se dializó (Thermo Fisher Scientific Inc., Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette), de tal manera que el tampón se reemplazó con HBSor (histidina 25 mM/sorbitol al 5 %, pH 6,0). El anticuerpo se concentró con el dispositivo de filtro UF centrífugo VIVASPIN20 (corte de peso molecular: UF10K, Sartorius Inc.), ajustando de esta manera la concentración de IgG a 20 mg/ml. Finalmente, el anticuerpo se filtró a través de un filtro Minisart-Plus (Sartorius Inc.) para obtener una muestra purificada.

[Ejemplo de referencia 1: Producción del anticuerpo anti-CDH6 NOV0712]

65 El anticuerpo anti-CDH6 NOV0712 usado en los Ejemplos se produjo con referencia a las secuencias de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera y de longitud completa de la cadena pesada (SEQ ID NO: 235 y SEQ ID NO:

234, respectivamente, en la Publicación Internacional N.º WO 2016/024195) de NOV0712 descritas en la Publicación Internacional N.º WO 2016/024195.

Ejemplo de referencia 1)-1 Anticuerpo anti-CDH6 NOV0712

Ejemplo de referencia 1)-1-1 Construcción del vector de expresión de cadena pesada del anticuerpo anti-CDH6 NOV0712

Se sintetizó un fragmento de ADN que codifica la región variable de la cadena pesada de NOV0712 de las posiciones de nucleótidos 36 a 428 en la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de NOV0712 mostrada en SEQ ID NO: 84 (GENEART). Se construyó un vector de expresión de cadena pesada de NOV0712 mediante el mismo método que el aplicado en el Ejemplo 4)-1-3. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de NOV0712 expresada por el vector de expresión de la cadena pesada de NOV0712 se muestra en SEQ ID NO: 83. En la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:83, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 1 a 19 es una secuencia señal.

Ejemplo de referencia 1)-1-2 Construcción del vector de expresión de cadena ligera del anticuerpo anti-CDH6 NOV0712

Se sintetizó un fragmento de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica la región variable de la cadena ligera de NOV0712 de las posiciones de nucleótidos 37 a 405 en la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de NOV0712 mostrada en SEQ ID NO: 82 (GENEART). Se construyó un vector de expresión de cadena ligera de NOV0712 mediante el mismo método que el aplicado en el Ejemplo 5)-5-2-1. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de NOV0712 expresada por el vector de expresión de la cadena ligera de NOV0712 se muestra en SEQ ID NO: 81. En la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:81, la secuencia de aminoácidos que consiste en los restos de aminoácidos en las posiciones 1 a 20 es una secuencia señal.

Ejemplo de referencia 1)-2 Preparación del anticuerpo anti-CDH6 NOV0712

Ejemplo de referencia 1)-2-1 Producción del anticuerpo anti-CDH6 NOV0712

NOV0712 se produjo mediante el mismo método que el aplicado en el Ejemplo 4)-2-1.

Ejemplo de referencia 1)-2-2 Purificación en una sola etapa del anticuerpo anti-CDH6 NOV0712

El anticuerpo anti-CDH6 NOV0712 se purificó a partir del sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo de referencia 1)-2-1 mediante el mismo método que el aplicado en el Ejemplo 4)-2-2 (concentración de anticuerpo: 5 mg/l de HBSor).

[Ejemplo 6: Evaluación *in vitro* de hG019 humanizado y NOV0712]

6)-1 Evaluación de la actividad de unión de hG019 humanizado

6)-1-1 Capacidad de unión a antígeno CDH6 humana de hG019 humanizado

La constante de disociación entre el anticuerpo y el antígeno (quimera CDH6 Fc His recombinante humana, R&D Systems, Inc.) se midió usando Biacore T200 (GE Healthcare Biosciences Corp.), de acuerdo con un método de captura, que comprende capturar el antígeno como ligando con el anticuerpo anti-His inmovilizado y a continuación medir la constante de disociación usando un anticuerpo como un analito. Aproximadamente 1000 UR del anticuerpo antihistidina (kit de captura de His, GE Healthcare Biosciences Corp.) se unieron covalentemente al chip sensor CM5 (GE Healthcare Biosciences Corp.) mediante el método de acoplamiento de amina. El anticuerpo también se inmovilizó en células de referencia de la misma manera que anteriormente. HBS-P+ (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, Tensioactivo P20 al 0,05 %) suplementado con CaCl₂ 1 mM se usó como un tampón de ejecución. El antígeno se añadió al chip inmovilizado con el anticuerpo antihistidina durante 60 segundos y a continuación se añadió una solución de dilución en serie (0,391 a 100 nM) del anticuerpo a un caudal de 30 µl/min durante 300 segundos. Posteriormente, la fase de disociación se monitorizó durante 600 segundos. Como una solución de regeneración, se añadió una solución de glicina (pH 1,5) suplementada con MgCl₂ 5 M dos veces a un caudal de 10 µl/min durante 30 segundos. En el análisis de datos se usó un modelo de afinidad de estado estable en un software de análisis (software BIAevaluation, versión 4.1) y se calculó la constante de disociación (KD). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

[Tabla 2]

	Anticuerpo	KD (M)
1	H01L02	1,5E-09

(continuación)

	Anticuerpo	KD (M)
2	H02L02	1,1E-09
3	H02L03	1,4E-09
4	H04L02	1,1E-09

6)-1-2 Actividad de unión contra CDH6 humana, de mono, de ratón o de rata

- 5 Usando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), pcDNA3.1-hCDH6, pcDNA3.1-cynoCDH6, p3xFLAG-CMV-9-mCDH6, o p3xFLAG-CMV-9-rCDH6 producidos en el Ejemplo 1)-1 se introdujeron transitoriamente en células 293α. Las células se cultivaron durante la noche en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % y, en lo sucesivo, se preparó una suspensión celular. Se usaron células 293α no transfectadas como un control negativo. La suspensión de células 293α producida como se describió anteriormente se centrifugó y a continuación se eliminó el sobrenadante. En lo
- 10 sucesivo, las células se suspendieron mediante la adición de cada uno de los 4 anticuerpos humanizados hG019 (clones N.º: H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02), que se habían preparado en el Ejemplo 5)-5-3, o control de IgG1 humana (Calbiochem). Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 % y a continuación se suspendieron mediante la adición de anti-IgG humana, Fc(gamma) PE de cabra F(ab') (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) que se había diluido 500 veces con
- 15 PBS suplementado con FBS al 5 %. Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 %, seguido de detección usando un citómetro de flujo (Canto II; BD Biosciences). Los datos se analizaron usando FlowJo (Tree Star, Inc.). En las Figuras 6-1 y 6-2, la abscisa representa la concentración de anticuerpos y la ordenada representa la cantidad del anticuerpo unido basado en la intensidad de fluorescencia media. Como se muestra en las Figuras 6-1 y 6-2, el control de IgG1 humana como un control negativo
- 20 no se une a ninguna de las células transfectadas con CDH6. Los 4 anticuerpos humanizados hG019 (clones N.º: H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02) se unen a CDH6 humana y a CDH6 de macaco cangrejero, pero no se unen a CDH6 de ratón ni de rata. Ninguno de los anticuerpos se une a las células transfectadas con el vector vacío pcDNA3.1 como un control negativo. Por otro lado, la Publicación Internacional N.º WO 2016/024195 desvela que el anticuerpo NOV0712 exhibe actividad de unión contra todos de CDH6 humana, CDH6 de macaco cangrejero, CDH6 de ratón y
- 25 CDH6 de rata. Como resultado, se demostró que los 4 anticuerpos humanizados hG019 obtenidos en la presente descripción son anticuerpos anti-CDH6 que exhiben propiedades de unión diferentes a las del anticuerpo NOV0712.

6)-2 Análisis de los sitios de unión a CDH6 de hG019 humanizado y NOV0712

30 6)-2-1 Análisis de epítomos usando mutantes con eliminación de dominio

- Usando Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), cada vector de expresión mutante de eliminación de dominio producido en el Ejemplo 2)-2-1, o pcDNA3.1-hCDH6 para la expresión de CDH6 humana de longitud completa se introdujo transitoriamente en células. Las células se cultivaron durante la noche en condiciones de 37 °C y CO₂ al
- 35 5 % y, en lo sucesivo, se preparó una suspensión celular. La suspensión de las células 293α transfectadas se centrifugó y a continuación se eliminó el sobrenadante. En lo sucesivo, las células se suspendieron mediante la adición de cada uno de los 4 anticuerpos humanizados hG019 (clones N.º: H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02), que se habían preparado en el Ejemplo 5)-5-3, o el anticuerpo anti-CDH6 NOV0712, que se había preparado en el Ejemplo de referencia 1, o IgG1 humana (Calbiochem) como un control negativo. Las células se dejaron reposar a 4 °C durante
- 40 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 % y a continuación se suspendieron mediante la adición de APC-anti-IgG humana de cabra F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) que se había diluido 500 veces con PBS suplementado con FBS al 5 %. Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 %, seguido de detección usando un citómetro de flujo (Canto II; BD Biosciences). Los datos se analizaron usando FlowJo (Tree Star, Inc.). Los resultados se
- 45 muestran en las Figuras 7-1 a 7-6. En los histogramas de las Figuras 7-1 a 7-6, la abscisa representa la intensidad de fluorescencia de APC, que indica la cantidad de anticuerpo unido, y la ordenada representa el recuento celular. El histograma sombreado muestra que se usaron células 293α no transfectadas de control negativo y el histograma de línea sólida abierta muestra que se usaron células 293α que expresan hCDH6 de longitud completa o cada mutante de eliminación del dominio EC. La intensidad de la fluorescencia aumenta cuando el anticuerpo se une al hCDH6 de
- 50 longitud completa o a cada mutante de eliminación del dominio EC en la superficie celular. El control de IgG1 humana no se une a ninguna de las células transfectadas. Los 4 anticuerpos humanizados hG019 (clones N.º: H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02) se unen a hCDH6 de longitud completa, el mutante de eliminación de EC1, el mutante de eliminación de EC2, el mutante de eliminación de EC4 y el mutante de eliminación de EC5, pero no se unen al mutante de eliminación de EC3. Específicamente, se demostró que los 4 anticuerpos hG019 humanizados se unen
- 55 específicamente a hCDH6 con EC3 como un epítipo. Por otro lado, el anticuerpo anti-CDH6 NOV0712 se une a hCDH6 de longitud completa, el mutante de eliminación de EC1, el mutante de eliminación de EC2, el mutante de eliminación de EC3 y el mutante de eliminación de EC4, pero no se une al mutante de eliminación de EC5. Específicamente, se demostró que el anticuerpo anti-CDH6 NOV0712 se une específicamente a hCDH6 con EC5 como un epítipo. Esto es consistente con la información del epítipo sobre NOV0712 descrita en la Publicación Internacional N.º WO 2016/024195. A partir de este resultado, se demostró que los 4 anticuerpos humanizados hG019
- 60

obtenidos en la presente descripción son anticuerpos anti-CDH6 que exhiben propiedades diferentes a las de NOV0712.

6)-2-2 Ensayo de competición de unión de anticuerpos

6)-2-2-1 Producción de la línea celular que expresa de forma estable 786-O/hCDH6

La línea celular de expresión estable 786-O/hCDH6 se produjo infectando células 786-O (ATCC) con un retrovirus recombinante para la expresión de CDH6 humana de longitud completa. Se produjo un vector de retrovirus de expresión de CDH6 humana (pQCXIN-hCDH6) usando un vector de expresión de ADNc que codifica la proteína CDH6 humana (NP_004923) (OriGene Technologies Inc., RC217889), e incorporando el ADNc en el vector de retrovirus pQCXIN (Clontech Laboratories, Inc.) de acuerdo con un método conocido por una persona experta en la materia. Usando FuGene HD (Promega Corp.), pQCXIN-hCDH6 se introdujo transitoriamente en las células de empaquetamiento de retrovirus RetroPack PT67 (Clontech Laboratories, Inc.). Después de 48 horas, se recuperó un sobrenadante de cultivo que contenía retrovirus recombinantes y a continuación se añadió al sistema de cultivo de células 786-O, de tal manera que las células se infectaron. A partir de 3 días después de la infección, las células infectadas se cultivaron en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % en un medio suplementado con G418 (Gibco) (concentración final: 50 mg/ml) y se analizaron con el fármaco, con el fin de establecer la línea celular 786-O/hCDH6 que exprese de forma estable CDH6 humana. La alta expresión de CDH6 humana en la línea de expresión estable se confirmó mediante citometría de flujo de la misma manera que la aplicada en el Ejemplo 2)-3-1 (Figura 8). El anticuerpo secundario de cabra anti-IgG1 de ratón Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific Inc.) que se había diluido 500 veces con PBS suplementado con FBS al 5 % se usó como un anticuerpo para la detección. Los resultados se muestran en la Figura 8. En el histograma de la Figura 8, la abscisa representa la intensidad de fluorescencia de Alexa Fluor 647 que indica la cantidad de anticuerpo unido, y la ordenada representa el recuento celular. El histograma sombreado muestra que se usó el control negativo mIgG1 en la tinción, y el histograma de línea sólida abierta muestra que se usó el anticuerpo anti-CDH6 humana en la tinción. Como se ve, la intensidad de la fluorescencia se mejoró mediante la unión del anticuerpo a hCDH6 en la superficie celular. El control de mIgG1 no se une a ninguna de las células. Como resultado, se demostró que la línea celular que expresa de forma estable 786-O/hCDH6 expresa CDH6 humana en mayor medida que la línea parental de células 786-O.

6)-2-2-2 Ensayo de competición de unión usando H01L02 marcado y NOV0712 marcado

Los anticuerpos etiquetados H01L02 y NOV0712 se produjeron usando un kit de marcaje de anticuerpos monoclonales Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific Inc.). La suspensión celular de la línea celular que expresa de forma estable 786-O/hCDH6 producida en 6)-2-2-1 se centrifugó y a continuación se eliminó el sobrenadante. En lo sucesivo, las células se suspendieron mediante la adición de NOV0712 marcado (concentración final: 5 nM) y, además, la adición de cada uno de los 4 anticuerpos hG019 humanizados (clones N.º: H01L02, H02L02, H02L03 y H04L02), que se habían preparado en el Ejemplo 5)-5-3, o el anticuerpo anti-CDH6 NOV0712, que se había preparado en el Ejemplo de referencia 1, o IgG1 humana (Calbiochem) como un control negativo (concentración final: como se muestra en la abscisa de la Figura 9). Las células se dejaron reposar a 4 °C durante 1 hora. En lo sucesivo, las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con FBS al 5 %, seguido de detección usando un citómetro de flujo (Canto II; BD Biosciences). Los datos se analizaron usando FlowJo (Tree Star, Inc.). Los resultados se muestran en la Figura 9. La abscisa representa la concentración final del anticuerpo no marcado añadido y la ordenada representa la cantidad de anticuerpo unido en función de la intensidad de fluorescencia media. Cuando se añade NOV0712 sin marcar a células suplementadas con NOV0712 marcado, la cantidad de anticuerpo marcado unido disminuye mediante el reemplazo con el anticuerpo no marcado de una manera dependiente de la concentración adicional porque compiten entre sí para unirse al mismo epítipo. Por otro lado, incluso si cada uno de los 4 anticuerpos hG019 humanizados o IgG1 humana como un control negativo se añade a las células suplementadas con NOV0712 marcado, no hay cambios en la cantidad de anticuerpo marcado unido, indicando que estos anticuerpos difieren en el epítipo y por lo tanto no compiten entre sí por la unión. De manera análoga, cuando cada uno de los 4 anticuerpos hG019 humanizados no marcados se añade a células suplementadas con H01L02 marcado, la cantidad de anticuerpo marcado unido disminuye mediante el reemplazo con el anticuerpo no marcado de una manera dependiente de la concentración adicional porque compiten entre sí para unirse al mismo epítipo. Por otro lado, incluso si se añade NOV0712 o IgG1 humana como un control negativo a las células suplementadas con H01L02 marcado, no hay cambios en la cantidad de anticuerpo marcado unido, indicando que estos anticuerpos difieren en el epítipo y por lo tanto no compiten entre sí por la unión.

6)-3 Evaluación de la actividad de internalización de hG019 humanizado y NOV0712

La actividad de internalización de hG019 humanizado y NOV0712 se evaluó usando un reactivo anti-IgG humana ZAP Humano (Advanced Targeting Systems) conjugado con una toxina (saporina) que inhibe la síntesis de proteínas. Específicamente, la línea celular de tumor de ovario positiva para CDH6 humana NIH:OVCAR-3 (ATCC) se sembró a 4×10^3 células/pocillo sobre una placa de 96 pocillos y después se cultivó durante la noche en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. La línea de células tumorales renales humanas positivas para CDH6 786-O (ATCC) se sembró a 1×10^3 células/pocillo en una placa de 96 pocillos y a continuación se cultivó durante la noche. La línea celular de tumor de ovario positiva para CDH6 humana PA-1 (ATCC) se sembró a 1×10^3 células/pocillo sobre una placa de 96 pocillos

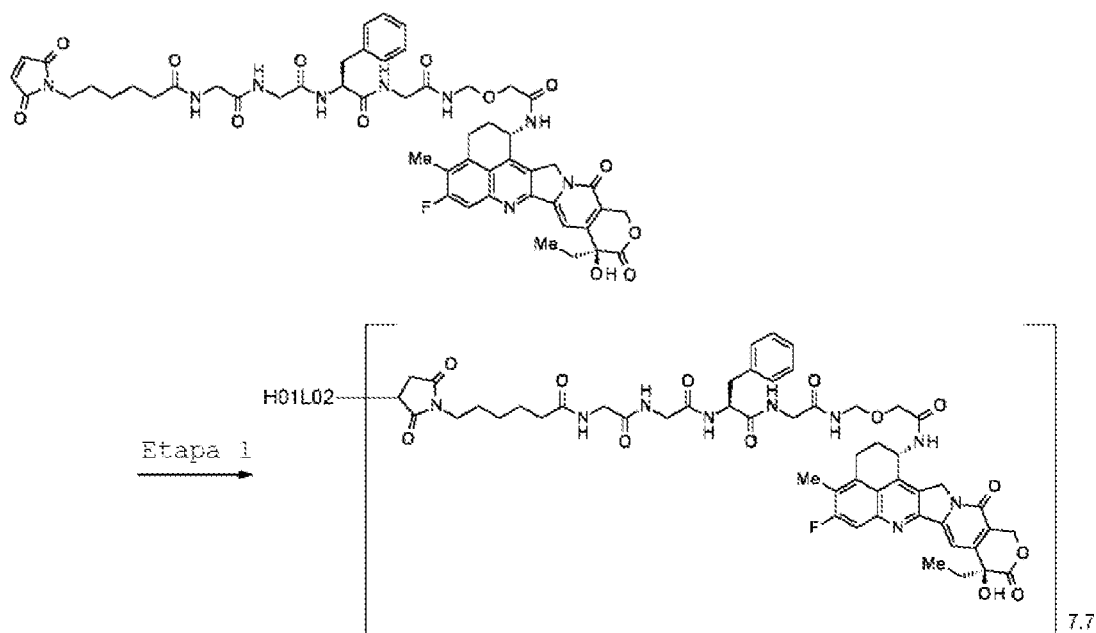
y después se cultivó durante la noche en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. El día siguiente, cada anticuerpo anti-CDH6 (concentración final: 1 nM) o anticuerpo IgG1 humano (Calbiochem) como un anticuerpo de control negativo se añadió a la placa. Zap Humano (concentración final: 0,5 nM) o fragmento F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana, Fragmento específico Fc (gamma) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) no conjugado con la toxina (concentración final: 0,5 nM) como un control negativo se añadió además a la placa y las células se cultivaron en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % durante 3 días. El número de células vivas se midió mediante la cuantificación de la actividad de ATP (ULR) usando el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo(TM). En esta evaluación, Zap humano se capta por las células de una manera que depende de la actividad de internalización del anticuerpo anti-CDH6 humanizado, de tal manera que la saporina, que inhibe la síntesis de proteínas, se libere en las células, con el fin de suprimir el crecimiento celular. Un efecto de inhibición del crecimiento celular producido por la adición del anticuerpo anti-CDH6 se indicó mediante una tasa de supervivencia relativa cuando el número de células vivas en un pocillo suplementado con el control negativo en lugar de Zap humano se definió como el 100 %. Las Figuras 10-1 a 10-3 muestran cada una un gráfico y una tabla de la tasa de supervivencia celular. En este experimento, se considera que un anticuerpo con fuerte actividad de internalización ofrece una baja tasa de supervivencia celular. Como resultado, los 4 anticuerpos hG019 humanizados tienen una tasa de internalización de aproximadamente el 50 al 75 % predicha a partir de las tasas de supervivencia celular para las 3 líneas celulares. Por lo tanto, los 4 anticuerpos hG019 humanizados exhiben una actividad de internalización muy alta y presentan una actividad de internalización mucho mayor que la de NOV0712. A partir del mecanismo de los efectos medicinales del ADC, se considera que un anticuerpo con mayor actividad de internalización es más adecuado como anticuerpo ADC.

[Ejemplo 7: Producción de conjugado de hG019 humanizado y fármaco]

7)-1 Producción del conjugado de anticuerpo y fármaco H01L02-DXd

Etapas 1: Conjugado de anticuerpo y fármaco (1)

[Fórmula 11]



Reducción de anticuerpo: El H01L02 producido en el Ejemplo 5 se ajustó a 9,85 mg/ml con PBS 6,0/EDTA usando procedimientos comunes B (usando 1,53 mlmg⁻¹cm⁻¹ como coeficiente de absorción a 280 nm) y C descritos en el método de producción 1. A esta solución (5,7 ml), se le añadieron una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,231 ml; 6,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrógeno fosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0855 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH dentro de 7,0 ± 0,1, el enlace disulfuro intercatenario en el anticuerpo se redujo incubando la solución a 37 °C durante 2 horas.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: La solución descrita anteriormente se incubó a 15 °C durante 10 minutos. Posteriormente, una solución de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-(2-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino)-2-oxoetoxi)metil]glicinamida 10 mM en dimetilsulfóxido (0,386 ml; 10 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a la misma, y la mezcla obtenida se incubó a 15 °C

durante 1 hora para conjugar el enlazador del fármaco con el anticuerpo. Posteriormente, una solución acuosa de 100 mM de NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,0347 ml; 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a la misma, y la mezcla obtenida se agitó aún más a temperatura ambiente durante 20 minutos para finalizar la reacción del enlazador de fármaco.

5

Purificación: La solución descrita anteriormente se purificó mediante el procedimiento común D descrito en el método de producción 1 para obtener 19 ml de una solución que contenía el conjugado de anticuerpo y fármaco del título "H01L02-ADC".

10 Caracterización: Usando el procedimiento común E (usando $\epsilon_{D,280} = 5440$ y $\epsilon_{D,370} = 21240$) descrito en el método de producción 1, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

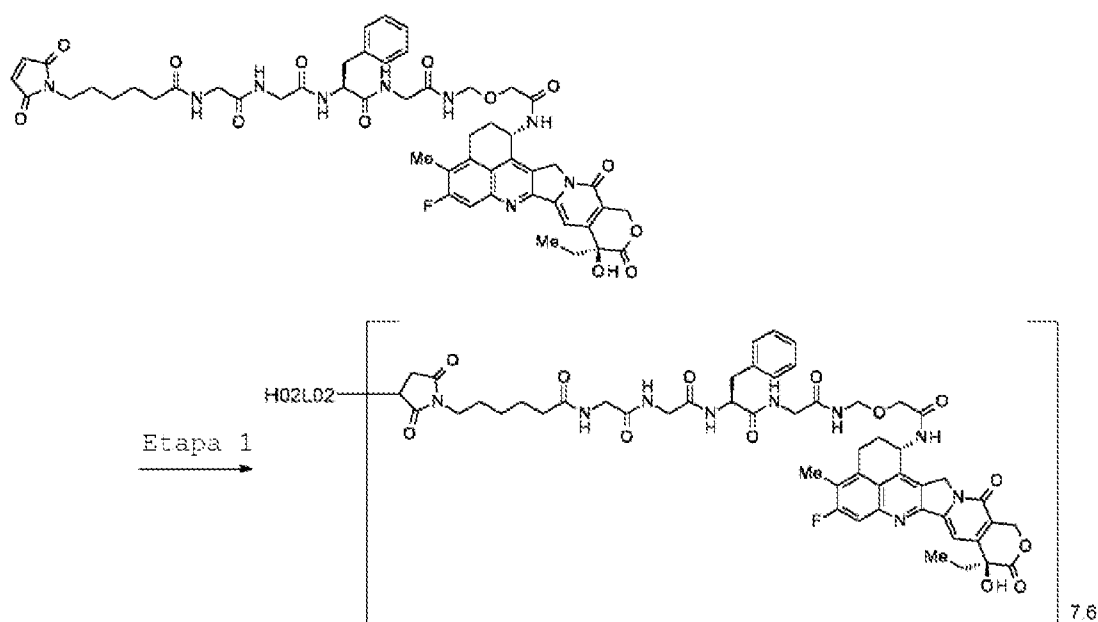
Concentración de anticuerpos: 2,26 mg/ml, rendimiento de anticuerpos: 42,9 mg (76 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido mediante el procedimiento común E: 5,9 y

15 número promedio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido mediante el procedimiento común F: 7,7.

7)-2 Producción del conjugado de anticuerpo y fármaco H02L02-DXd

20 Etapa 1: Conjugado de anticuerpo y fármaco (2)

[Fórmula 12]



25 Reducción de anticuerpo: El H02L02 producido en el Ejemplo 5 se ajustó a 9,95 mg/ml con PBS 6,0/EDTA usando procedimientos comunes B (usando $1,51 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como coeficiente de absorción a 280 nm) y C descritos en el método de producción 1. A esta solución (5,7 ml), se le añadieron una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,234 ml; 6,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrógeno fosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0855 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH dentro de $7,0 \pm 0,1$, el enlace disulfuro intercatenario en el anticuerpo se redujo incubando la solución a 37°C durante

30

2 horas.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: La solución descrita anteriormente se incubó a 15°C durante 10 minutos. Posteriormente, una solución de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-(2-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino)-2-oxoetoximetil]glicinamida 10 mM en dimetilsulfóxido (0,389 ml; 10 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a la misma, y la mezcla obtenida se incubó a 15°C durante 1 hora para conjugar el enlazador del fármaco con el anticuerpo. Posteriormente, una solución acuosa de 100 mM de NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,0350 ml; 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a la misma, y la mezcla obtenida se agitó aún más a temperatura ambiente durante 20 minutos para finalizar la reacción del enlazador de fármaco.

40

Purificación: La solución descrita anteriormente se purificó mediante el procedimiento común D descrito en el método de producción 1 para obtener 19 ml de una solución que contenía el conjugado de anticuerpo y fármaco del título "H02L02-ADC".

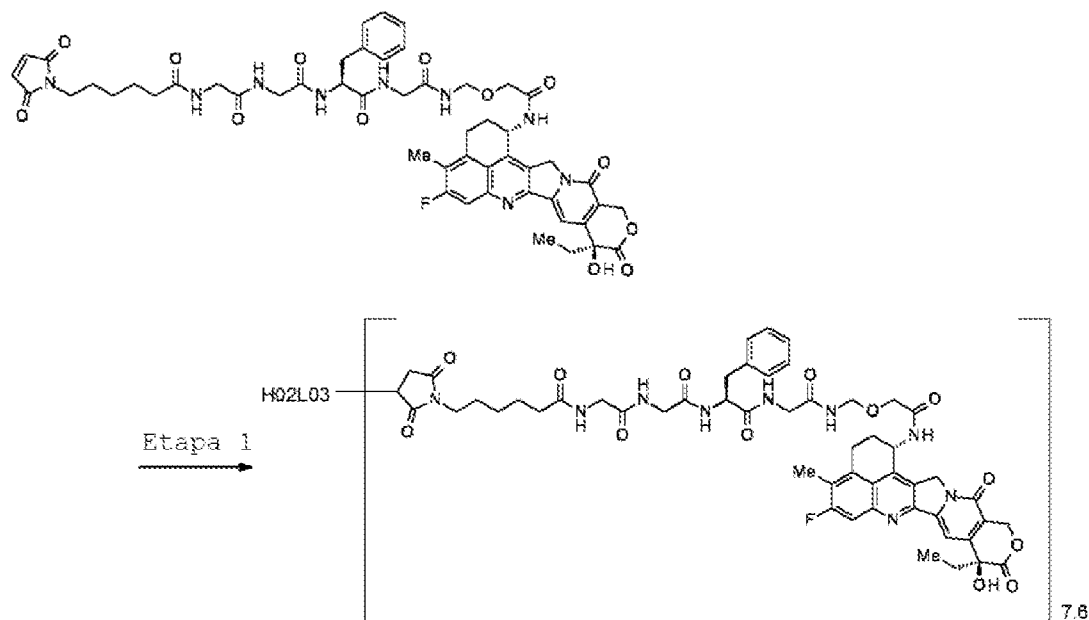
- 5 Caracterización: Usando el procedimiento común E (usando $\epsilon_{D,280} = 5440$ y $\epsilon_{D,370} = 21240$) descrito en el método de producción 1, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpos: 2,61 mg/ml, rendimiento de anticuerpos: 49,6 mg (87 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido mediante el procedimiento común E: 5,9 y
 10 número promedio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido mediante el procedimiento común F: 7,6.

7)-3 Producción del conjugado de anticuerpo y fármaco H02L03-DXd

- 15 Etapa 1: Conjugado de anticuerpo y fármaco (3)

[Fórmula 13]



- 20 Reducción de anticuerpo: El H02L03 producido en el Ejemplo 5 se ajustó a 9,86 mg/ml con PBS 6,0/EDTA usando procedimientos comunes B (usando $1,53 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como coeficiente de absorción a 280 nm) y C descritos en el método de producción 1. A esta solución (5,7 ml), se le añadieron una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,270 ml; 7,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrógeno fosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0855 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH dentro de $7,0 \pm 0,1$, el enlace disulfuro intercatenario en el anticuerpo se redujo incubando la solución a 37°C durante
 25 2 horas.

- Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: La solución descrita anteriormente se incubó a 15°C durante 10 minutos. Posteriormente, una solución de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-[[[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino]-2-oxoetoxi)metil]glicinamida 10 mM en dimetilsulfóxido (0,386 ml; 10 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a la misma, y la mezcla obtenida se incubó a 15°C
 30 durante 1 hora para conjugar el enlazador del fármaco con el anticuerpo. Posteriormente, una solución acuosa de 100 mM de NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,0347 ml; 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a la misma, y la mezcla obtenida se agitó aún más a temperatura ambiente durante 20 minutos para finalizar la reacción del enlazador de fármaco.
 35

Purificación: La solución descrita anteriormente se purificó mediante el procedimiento común D descrito en el método de producción 1 para obtener 19 ml de una solución que contenía el conjugado de anticuerpo y fármaco del título "H01L02-ADC".

- 40 Caracterización: Usando el procedimiento común E (usando $\epsilon_{D,280} = 5440$ y $\epsilon_{D,370} = 21240$) descrito en el método de

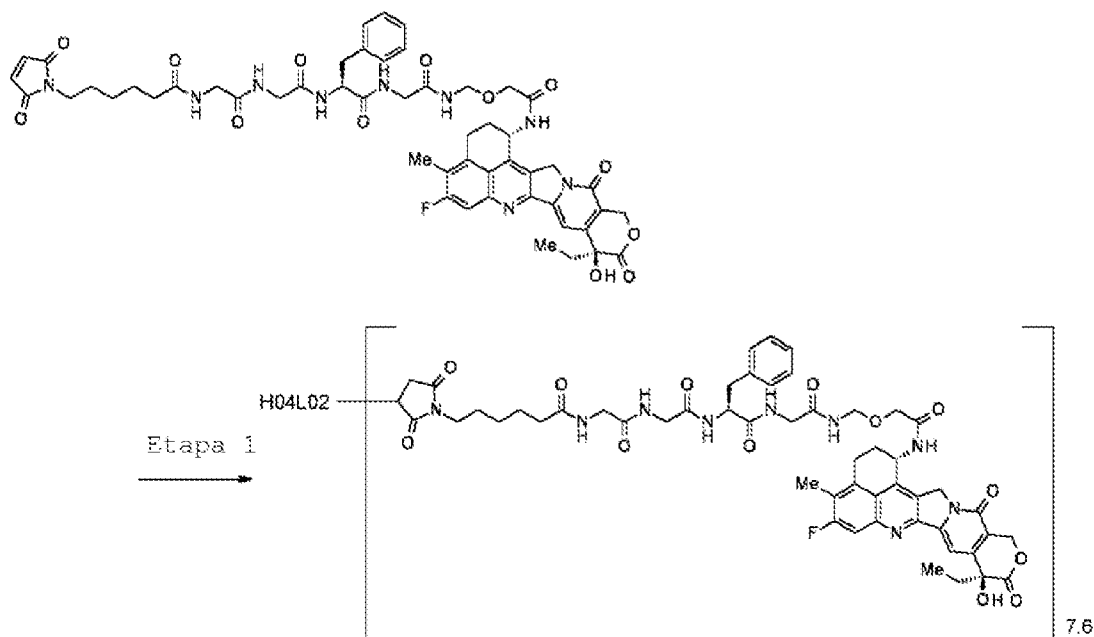
producción 1, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpos: 2,71 mg/ml, rendimiento de anticuerpos: 51,4 mg (91 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido mediante el procedimiento común E: 5,7 y número promedio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido mediante el procedimiento común F: 7,6.

7)-4 Producción del conjugado de anticuerpo y fármaco H04L02-DXd

Etapa 1: Conjugado de anticuerpo y fármaco (4)

[Fórmula 14]



Reducción de anticuerpo: El H04L02 producido en el Ejemplo 5 se ajustó a 9,86 mg/ml con PBS 6,0/EDTA usando procedimientos comunes B (usando $1,53 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como coeficiente de absorción a 280 nm) y C descritos en el método de producción 1. A esta solución (5,7 ml), se le añadieron una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,232 ml; 6,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrógeno fosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0855 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH dentro de $7,0 \pm 0,1$, el enlace disulfuro intercatenario en el anticuerpo se redujo incubando la solución a 37°C durante 2 horas.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: La solución descrita anteriormente se incubó a 15°C durante 10 minutos. Posteriormente, una solución de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino)-2-oxoetoxi)metil]glicinamida 10 mM en dimetilsulfóxido (0,386 ml; 10 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a la misma, y la mezcla obtenida se incubó a 15°C durante 1 hora para conjugar el enlazador del fármaco con el anticuerpo. Posteriormente, una solución acuosa de 100 mM de NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,0347 ml; 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a la misma, y la mezcla obtenida se agitó aún más a temperatura ambiente durante 20 minutos para finalizar la reacción del enlazador de fármaco.

Purificación: La solución descrita anteriormente se purificó mediante el procedimiento común D descrito en el método de producción 1 para obtener 19 ml de una solución que contenía el conjugado de anticuerpo y fármaco del título "H04L02-ADC".

Caracterización: Usando el procedimiento común E (usando $\epsilon_{D,280} = 5440$ y $\epsilon_{D,370} = 21240$) descrito en el método de producción 1, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpos: 2,56 mg/ml, rendimiento de anticuerpos: 48,7 mg (87 %), número promedio de

moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido mediante el procedimiento común E: 5,8 y número promedio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido mediante el procedimiento común F: 7,6.

5 [Ejemplo de referencia 2: Producción del conjugado de NOV0712 y fármaco]

Ejemplo de referencia 2)-1 Producción del conjugado de anticuerpo y fármaco NOV0712-DM4

Conjugado de anticuerpo y fármaco (5)

10 Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: El NOV0712 producido en el Ejemplo de referencia 1 se ajustó a 9,7 mg/ml con HEPES8.1 20 mM (HEPES, solución tampón 1 M (20 ml) fabricada por Life Technologies Corp. se ajustó a un pH de 8,1 con hidróxido sódico 1 M y a continuación se llevó a 1 l con agua destilada) usando los procedimientos comunes B (usando $1,51 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como coeficiente de absorción a 280 nm) y C descritos en el
 15 método de producción 1. La solución se incubó a 20 °C durante 10 minutos. Posteriormente, una solución de ácido 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)-1-oxo-4-(piridin-2-ildisulfanil)butano-2-sulfónico 10 mM descrito en el documento WO2016/024195 en DMA (0,366 ml; 5,2 equivalentes por molécula de anticuerpo), una solución de N2-desacetil-desacetil-N2-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina 10 mM (DM4) en DMA (0,366 ml; 6,8 equivalentes por molécula de anticuerpo) y 0,243 ml de DMA se añadieron a la misma y la mezcla obtenida se incubó a 20 °C durante
 20 16 horas para conjugar el enlazador de fármaco con el anticuerpo. Posteriormente, se añadió una solución acuosa de ácido acético 1 M para ajustar el pH a 5,0 y la mezcla obtenida se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 20 minutos para terminar la reacción del enlazador de fármaco.

25 Purificación: La solución descrita anteriormente se purificó mediante el procedimiento común D descrito en el método de producción 1 para obtener 28 ml de una solución que contenía el conjugado de anticuerpo y fármaco del título "NOV0712-DM4".

30 Caracterización: Usando el procedimiento común E (usando $\epsilon_{A,280} = 200500$, $\epsilon_{A,252} = 76295$, $\epsilon_{D,280} = 43170$ y $\epsilon_{D,252} = 23224$) descrito en el método de producción 1, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

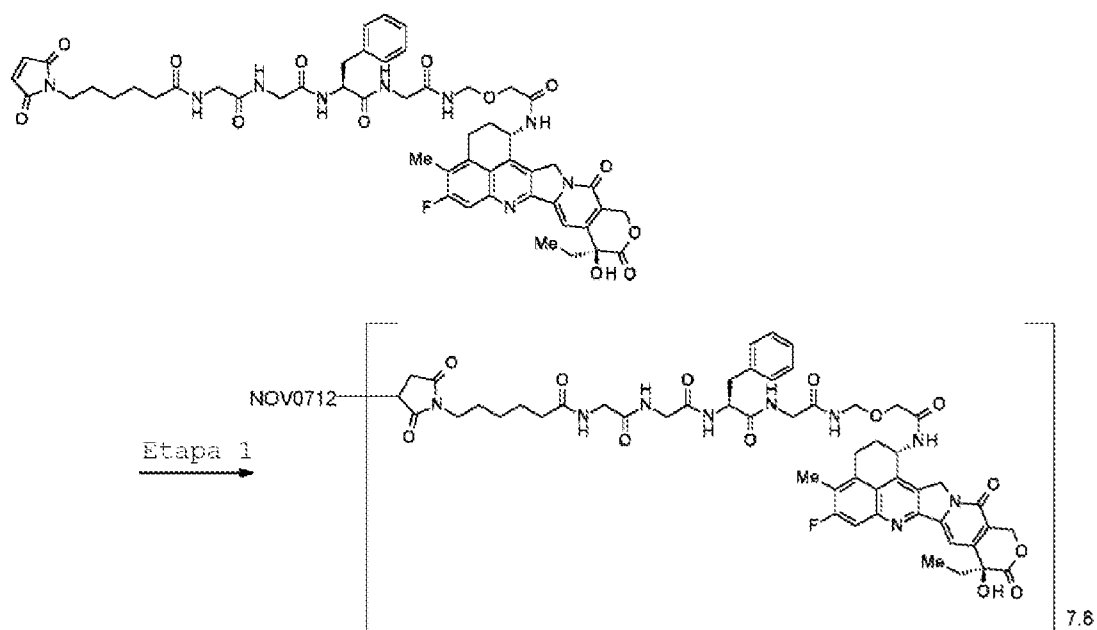
Concentración de anticuerpos: 2,58 mg/ml, rendimiento de anticuerpos: 72,2 mg (93 %) y número promedio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido mediante el procedimiento común E: 3,0.

Ejemplo de referencia 2)-2 Producción del conjugado de anticuerpo y fármaco NOV0712-DXd

35

Etapas 1: Conjugado de anticuerpo y fármaco (6)

[Fórmula 15]



40 Reducción de anticuerpo: El NOV0712 producido en el Ejemplo de referencia 1 se ajustó a 9,26 mg/ml con PBS 6,0/EDTA usando procedimientos comunes B (usando $1,5 \text{ mlmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como coeficiente de absorción a 280 nm) y C

descritos en el método de producción 1. A esta solución (6,6 ml), se le añadieron una solución acuosa de TCEP 10 mM (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) (0,254 ml; 6,0 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución acuosa de hidrógeno fosfato dipotásico 1 M (Nacalai Tesque, Inc.; 0,0990 ml). Después de confirmar que la solución tenía un pH dentro de $7,0 \pm 0,1$, el enlace disulfuro intercatenario en el anticuerpo se redujo incubando la solución a 37 °C durante 2 horas.

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: La solución descrita anteriormente se incubó a 15 °C durante 10 minutos. Posteriormente, una solución de N-[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil]glicilglicil-L-fenilalanil-N-[(2-[(1S,9S)-9-etil-5-fluoro-9-hidroxi-4-metil-10,13-dioxo-2,3,9,10,13,15-hexahidro-1H,12H-benzo[de]pirano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinolin-1-il]amino)-2-oxoetoxi)metil]glicinamida 10 mM en dimetilsulfóxido (0,381 ml; 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a la misma, y la mezcla obtenida se incubó a 15 °C durante 1 hora para conjugar el enlazador del fármaco con el anticuerpo. Posteriormente, una solución acuosa de 100 mM de NAC (Sigma-Aldrich Co. LLC) (0,0381 ml; 9 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadió a la misma, y la mezcla obtenida se agitó aún más a temperatura ambiente durante 20 minutos para finalizar la reacción del enlazador de fármaco.

Purificación: La solución descrita anteriormente se purificó mediante el procedimiento común D descrito en el método de producción 1 para obtener 23,5 ml de una solución que contenía el conjugado de anticuerpo y fármaco del título "NOV0712-ADC".

Caracterización: Usando el procedimiento común E (usando $\epsilon_{D,280} = 5440$ y $\epsilon_{D,370} = 21240$) descrito en el método de producción 1, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpos: 2,26 mg/ml, rendimiento de anticuerpos: 56,4 mg (92 %), número promedio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido mediante el procedimiento común E: 6,4 y número promedio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido mediante el procedimiento común F: 7,8.

[Ejemplo de referencia 3: Producción de H01L02-DM4]

Ejemplo de referencia 3)-1 Producción del conjugado de anticuerpo y fármaco H01L02-DM4

Conjugado de anticuerpo y fármaco (7)

Conjugación entre anticuerpo y enlazador de fármaco: El H01L02 producido en el Ejemplo 5 se ajustó a 9,8 mg/ml con HEPES8.1 20 mM (HEPES, solución tampón 1 M (20 ml) fabricada por Life Technologies Corp. se ajustó a un pH de 8,1 con hidróxido sódico 1 M y a continuación se llevó a 1 l con agua destilada) usando los procedimientos comunes B (usando $1,53 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como coeficiente de absorción a 280 nm) y C descritos en el método de producción 1. La solución se incubó a 20 °C durante 10 minutos. Posteriormente, una solución de ácido 1-(2,5-dioxopirrolidin-1-iloxi)-1-oxo-4-(piridin-2-ildisulfanil)butano-2-sulfónico 10 mM descrito en el documento WO2016/024195 en DMA (0,062 ml; 11,5 equivalentes por molécula de anticuerpo) y una solución de N2-desacetil-N2-(4-metil-4-mercapto-1-oxopentil)-maitansina 10 mM (DM4) en DMA (0,082 ml; 15,1 equivalentes por molécula de anticuerpo) se añadieron a la misma, y la mezcla obtenida se incubó a 20 °C durante 18 horas para conjugar el enlazador del fármaco con el anticuerpo. Posteriormente, se añadió una solución acuosa de ácido acético 1 M para ajustar el pH a 5,0 y la mezcla obtenida se agitó adicionalmente a temperatura ambiente durante 20 minutos para terminar la reacción del enlazador de fármaco.

Purificación: La solución descrita anteriormente se purificó mediante el procedimiento común D descrito en el método de producción 1 para obtener 3,5 ml de una solución que contenía el conjugado de anticuerpo y fármaco del título "H01L02-DM4".

Caracterización: Usando el procedimiento común E (usando $\epsilon_{A,280} = 223400$, $\epsilon_{A,252} = 85646$, $\epsilon_{D,280} = 4317$ y $\epsilon_{D,252} = 23224$) descritos en el método de producción 1, se obtuvieron los siguientes valores característicos.

Concentración de anticuerpos: 1,97 mg/ml, rendimiento de anticuerpos: 6,90 mg (88 %) y número promedio de moléculas de fármaco conjugado (n) por molécula de anticuerpo medido mediante el procedimiento común E: 3,6.

[Ejemplo 8: Evaluación de la actividad *in vitro* del conjugado de anticuerpo y fármaco]

8)-1 Evaluación de la actividad *in vitro* de inhibición del crecimiento celular del conjugado de anticuerpo y fármaco contra la línea celular tumoral humana positiva para CDH6

La línea celular de tumor de ovario humana positiva para CDH6 PA-1 se sembró sobre una placa de 96 pocillos a 2×10^3 células/100 μl /pocillo en medio MEM suplementado con FBS al 10 %, y las células se cultivaron después durante la noche en condiciones de 37 °C y CO_2 al 5 %. El día siguiente, cada uno de los 4 conjugados de hG019 humanizado y fármaco (nombres de los clones: H01L02-DXd, H02L02-DXd, H02L03-DXd y H04L02-DXd) producidos en el Ejemplo 7, o el conjugado de NOV0712 y fármaco (NOV0712-DM4) producido en el Ejemplo de referencia 2 se añadió a las

células de tal manera que las concentraciones finales fueran de 0,0001 (nM) a 100 (nM). Después de un cultivo durante 4 días, el número de células vivas se midió mediante la cuantificación de ATP usando un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo(TM) (Promega Corp.). La Figura 11 muestra la actividad de inhibición del crecimiento celular dependiente de la concentración cuando se añadió cada conjugado de anticuerpo y fármaco a las células. A partir de este resultado, se demostró que los 4 conjugados de hG019 humanizado y fármaco exhiben actividad de inhibición del crecimiento contra células tumorales a partir de una concentración de adición menor que la del conjugado NOV0712-fármaco y tienen alta actividad antitumoral.

[Ejemplo 9: Efecto antitumoral *in vivo* del conjugado de anticuerpo y fármaco]

Los efectos antitumorales de los conjugados de anticuerpo y fármaco se evaluaron usando modelos animales derivados de ratones inmunodeficientes mediante la inoculación de células de la línea celular tumoral humana positivas para CDH6. Los ratones desnudos BALB/c de cuatro a 5 semanas de edad (CAnN.Cg-Foxnl[nu]/CrIcrlj[Foxnlnu/Foxnlnu], Charles River Laboratories Japan Inc.) y los ratones SCID (CB17/lcr-Prkdc[scid]/CrIcrlj, Charles River Laboratories Japan Inc.) se aclimataron durante 3 días o más en condiciones SPF antes de su uso en el experimento. Los ratones fueron alimentados con una dieta sólida esterilizada (FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd) y se les suministró agua del grifo esterilizada (que se había preparado añadiendo una solución de hipoclorito sódico de 5 a 15 ppm al agua del grifo). El diámetro largo y el diámetro corto del tumor inoculado se midieron dos veces por semana usando calibradores digitales electrónicos (CD-15CX, Mitutoyo Corp.), y a continuación se calculó el volumen del tumor de acuerdo con la siguiente expresión.

Cada conjugado de anticuerpo y fármaco se diluyó con tampón ABS (tampón acetato 10 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,5) (Nacalai Tesque, Inc.), y la dilución se administró por vía intravenosa a una dosis mostrada en cada Ejemplo en la cola de cada ratón. El tampón ABS se administró de la misma manera que anteriormente a un grupo de control (grupo de vehículo). Se usaron seis ratones por grupo en el experimento.

9)-1 Efecto antitumoral - (1)

La línea celular de tumor de células renales humanas positivas para CDH6 786-O (ATCC), cuya expresión de CDH6 se había confirmado en el Ejemplo 2)-3-1, se suspendió en Matrigel (Corning Inc.) y la suspensión celular se inoculó por vía subcutánea a una dosis de 5×10^6 células en la región del flanco derecho de cada ratón SCID macho (Día 0). El Día 18, los ratones se agruparon aleatoriamente. El día de la agrupación, cada uno de los 4 conjugados de anticuerpo y fármaco (nombres de los clones: H01L02-DXd, H02L02-DXd, H02L03-DXd y H04L02-DXd) producidos en el Ejemplo 7, o NOV0712-DM4 producido en el Ejemplo de referencia 2, se administraron por vía intravenosa a una dosis de 3 mg/kg en la cola de cada ratón. Los resultados se muestran en la Figura 12. La abscisa representa el número de días y la ordenada representa el volumen tumoral. El intervalo de error representa un valor de SE.

NOV0712-DM4 no presentó ningún efecto antitumoral significativo en este modelo de tumor. Los 4 conjugados de anticuerpo y fármaco producidos en el Ejemplo 7 disminuyeron el volumen tumoral después de la administración, ejercieron una regresión tumoral significativa y sostuvieron el efecto de regresión tumoral durante 24 días después de la administración (Figura 12).

9)-2 Efecto antitumoral - (2)

La línea celular de tumor de ovario humanas positivas para CDH6 PA-1 (ATCC), cuya expresión de CDH6 se había confirmado en el Ejemplo 2)-3-1, se suspendió en Matrigel (Corning Inc.) y la suspensión celular se inoculó por vía subcutánea a una dosis de $8,5 \times 10^6$ células en la región del flanco derecho de cada ratón desnudo hembra (Día 0). El Día 11, los ratones se agruparon aleatoriamente. El día de la agrupación, el conjugado de anticuerpo y fármaco H01L02-DXd producido en el Ejemplo 7, o NOV0712-DM4 o NOV0712-DXd producido en el Ejemplo de Referencia 2 se administraron por vía intravenosa en dosis de 1 o 3 mg/kg en la cola de cada ratón. Los resultados se muestran en la Figura 13. La abscisa representa el número de días y la ordenada representa el volumen tumoral. El intervalo de error representa un valor de SE.

NOV0712-DM4 no presentó ningún efecto antitumoral en ninguna de las dosis de 1 y 3 mg/kg en este modelo de tumor. Por otro lado, H01L02-DXd disminuyó significativamente el volumen tumoral después de la administración a ambas de las dosis de 1 y 3 mg/kg y ejerció un efecto de regresión tumoral (Figura 13). El anticuerpo H01L02 obtenido en la presente descripción y el anticuerpo NOV0712 se conjugaron con el mismo fármaco DXd y se compararon los efectos medicinales de las muestras resultantes. Como resultado, H01L02-DXd ejerció un efecto antitumoral más fuerte que el de NOV0712-DXd en ambas de las dosis de 1 y 3 mg/kg. Específicamente, se demostró que el anticuerpo H01L02 de la presente invención es un anticuerpo superior para conjugados de anticuerpo y fármaco como agentes antitumorales al anticuerpo NOV0712 (Figura 13).

9)-3 Efecto antitumoral - (3)

La línea celular de tumor de ovario humanas positivas para CDH6 NIH:OVCAR-3 (ATCC), cuya expresión de CDH6 se había confirmado en el Ejemplo 2)-3-1, se suspendió en Matrigel (Corning Inc.) y la suspensión celular se inoculó

por vía subcutánea a una dosis de 1×10^7 células en la región del flanco derecho de cada ratón desnudo hembra (Día 0). El Día 22, los ratones se agruparon aleatoriamente. El día de la agrupación, el conjugado de anticuerpo y fármaco H01L02-DXd producido en el Ejemplo 7, o NOV0712-DM4 producido en el Ejemplo de Referencia 2 se administraron por vía intravenosa en dosis de 1 o 3 mg/kg en la cola de cada ratón. Los resultados se muestran en la Figura 14. La abscisa representa el número de días y la ordenada representa el volumen tumoral. El intervalo de error representa un valor de SE.

NOV0712-DM4 no mostró ningún efecto antitumoral a la dosis de 1 mg/kg y mostró un efecto antitumoral a la dosis de 3 mg/kg, aunque se observó un recrecimiento del tumor a partir de las 2 semanas después de la administración. Por otro lado, H01L02-DXd suprimió significativamente el aumento del volumen tumoral después de la administración a ambas de las dosis de 1 y 3 mg/kg y sostuvo, particularmente, a la dosis de 3 mg/kg, el efecto de inhibición del crecimiento tumoral durante un largo período de 31 días después de la administración (Figura 14).

El efecto de inhibición del crecimiento tumoral de NOV0712-DM4 producido en el Ejemplo de referencia 2 o H01L02-DM4 producido en el Ejemplo de referencia 3 se evaluó de la misma manera que anteriormente usando células PA-1. H01L02-DM4 redujo aún más el volumen del tumor que NOV0712-DM4. Por lo tanto, el anticuerpo H01L02 de la presente invención es superior como un anticuerpo para conjugados de anticuerpo y fármaco que actúan como agentes antitumorales en comparación con el anticuerpo NOV0712.

9)-4 Efecto antitumoral - (4)

La línea celular de tumor de células renales humanas positivas para CDH6 786-O (ATCC), cuya expresión de CDH6 se había confirmado en el Ejemplo 2)-3-1, se suspendió en Matrigel (Corning Inc.) y la suspensión celular se inoculó por vía subcutánea a una dosis de 5×10^6 células en la región del flanco derecho de cada ratón SCID macho (Día 0). El Día 20, los ratones se agruparon aleatoriamente. El día de la agrupación, el conjugado de anticuerpo y fármaco H01L02-DXd producido en el Ejemplo 7, o NOV0712-DM4 producido en el Ejemplo de Referencia 2 se administraron por vía intravenosa en dosis de 1 o 3 mg/kg en la cola de cada ratón. Los resultados se muestran en la Figura 15. La abscisa representa el número de días y la ordenada representa el volumen tumoral. El intervalo de error representa un valor de SE.

NOV0712-DM4 no presentó ningún efecto antitumoral significativo en ninguna de las dosis de 1 y 3 mg/kg en este modelo de tumor. Por otro lado, H01L02-DXd disminuyó el volumen tumoral después de la administración en ambas de las dosis de 1 y 3 mg/kg y ejerció, particularmente, a la dosis de 3 mg/kg, regresión tumoral significativa y sostuvieron el efecto de regresión tumoral durante 20 días después de la administración (Figura 15).

9)-5 Efecto antitumoral - (5)

La línea celular de tumor de ovario humanas negativas para CDH6 ES-2 (ATCC), cuya ausencia de la expresión de CDH6 se había confirmado en el Ejemplo 2)-3-1, se suspendió en solución salina fisiológica y la suspensión celular se inoculó por vía subcutánea a una dosis de 1×10^6 células en la región del flanco derecho de cada ratón desnudo hembra (Día 0). El Día 7, los ratones se agruparon aleatoriamente. El día de la agrupación, el conjugado de anticuerpo y fármaco H01L02-DXd producido en el Ejemplo 7, o NOV0712-DM4 producido en el Ejemplo de Referencia 2 se administraron por vía intravenosa en dosis de 1 o 3 mg/kg en la cola de cada ratón. Los resultados se muestran en la Figura 16. La abscisa representa el número de días y la ordenada representa el volumen tumoral. El intervalo de error representa un valor de SE.

En este modelo de tumor que no expresa CDH6, H01L02-DXd y NOV0712-DM4 no mostraron efecto antitumoral a ninguna de las dosis. A partir de este resultado, el efecto antitumoral del conjugado de anticuerpo y fármaco en el modelo de tumor CDH6-positivo demostrado en los Ejemplos 9)-1, 9)-2, 9)-3 y 9)-4 es un efecto que depende de la expresión de CDH6 en las células tumorales. Por lo tanto, el conjugado de anticuerpo y fármaco de la presente invención se considera un fármaco antitumoral selectivo y seguro que exhibe específicamente un efecto antitumoral sobre el tumor positivo para CDH6 sin provocar citotoxicidad en los tejidos normales negativos para CDH6 (Figura 16).

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona un anticuerpo anti-CDH6 que tiene actividad de internalización y un conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende el anticuerpo. El conjugado de anticuerpo y fármaco puede usarse como un fármaco terapéutico para el cáncer y similares.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo, o un fragmento funcional de un anticuerpo, que se une específicamente a la secuencia de aminoácidos del dominio EC3 de la cadherina-6 mostrada en SEQ ID NO: 4 y que tiene capacidad de internalización que permite la captación celular, en donde el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo comprende CDRL1, CDRL2 y CDRL3 en una combinación cualquiera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes combinaciones (1) a (4):

(1) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14,

(2) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 24,

(3) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 32, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 33 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34 y

(4) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 42, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44 y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 en una combinación cualquiera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes combinaciones (5) a (9):

(5) CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19,

(6) CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 27, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 28 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 29,

(7) CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 37, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 38 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 39,

(8) CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 47, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 48 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 49 y

(9) CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19.

2. El anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende CDRL1, CDRL2 y CDRL3 y CDRH1, CDRH2 y CDRH3 en cualquier combinación seleccionada del grupo que consiste en las siguientes combinaciones (1) a (5):

(1) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14 y CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19,

(2) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 24 y CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 27, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 28 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 29,

(3) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 32, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 33 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34 y CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 37, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 38 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 39,

(4) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 42, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44 y CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 47, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 48 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 49 y

(5) CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14 y CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60 y CDRH3 que consiste en la

secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19.

3. El anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que está humanizado.

5 4. El anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo tiene una región variable de cadena ligera cualquiera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes regiones variables (1) a (4):

- 10 (1) una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 63,
- (2) una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 67,
- (3) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 95 % o más con la secuencia de una región marco distinta a cada secuencia CDR en las secuencias de aminoácidos de (1) y (2) y
- 15 (4) una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, una sustitución o una adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de una región marco distinta a cada secuencia CDR en las secuencias de aminoácidos de (1) a (3), y una región variable de cadena pesada cualquiera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes regiones variables (5) a (9):
- (5) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 71,
- 20 (6) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 75,
- (7) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 79,
- 25 (8) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia de al menos el 95 % o más con la secuencia de una región marco distinta a cada secuencia CDR en las secuencias de aminoácidos de (5) a (7) y
- (9) una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, una sustitución o una adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de una región marco distinta a cada secuencia CDR en las secuencias de aminoácidos de (5) a (8).
- 30

5. El anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada en cualquiera de las siguientes combinaciones (1) a (4):

- 35 (1) una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 63 y una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 71,
- (2) una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 63 y una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 75,
- 40 (3) una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 67 y una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 75 y
- 45 (4) una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 63 y una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 79.

6. El anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo tiene cualquiera de las siguientes combinaciones (1) a (4):

- 50 (1) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 69,
- (2) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73,
- 55 (3) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 65 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73 y
- (4) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 77.
- 60

7. El anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 69.

65 8. El anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y

una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73.

9. El anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 65 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73.

10. El anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo tiene una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 77.

11. El fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el fragmento funcional se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab')₂, Fab' y Fv.

12. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 63 y una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 71.

13. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 12, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado que comprende una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 69.

14. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.

15. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende polinucleótidos en una combinación cualquiera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes combinaciones (1) a (5):

- (1) un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 18 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19,
- (2) un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 22, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 23 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 24, y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 27, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 28 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 29,
- (3) un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 32, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 33 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 34, y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 37, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 38 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 39,
- (4) un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 42, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 43 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 44, y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 47, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 48 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 49 y
- (5) un polinucleótido que codifica una región variable de cadena ligera que comprende CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 12, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 13 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 14, y un polinucleótido que codifica una región variable de cadena pesada que comprende CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 17, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 60 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 19.

16. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y un polinucleótido que codifica una cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en:

- (1) una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO:

69,

(2) una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73 y

(3) una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 77.

17. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 65 y un polinucleótido que codifica una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73.

18. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17.

19. Células hospedadoras transformadas con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 18, preferentemente en donde las células hospedadoras son células eucariotas.

20. Un método para producir un anticuerpo de interés o un fragmento funcional del anticuerpo, que comprende la etapa de cultivar las células hospedadoras de acuerdo con la reivindicación 19 y la etapa de recoger un anticuerpo de interés o un fragmento funcional del anticuerpo del cultivo obtenido mediante la etapa mencionada anteriormente.

21. El anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la cadena pesada o la cadena ligera han sido sometidas a una o dos o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en glucosilación ligada a N, glucosilación ligada a O, procesamiento N-terminal, procesamiento C-terminal, desamidación, isomerización de ácido aspártico, oxidación de metionina, adición de un resto de metionina al extremo N, amidación de un resto de prolina, conversión de glutamina N-terminal o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico y una eliminación de uno o dos aminoácidos del extremo carboxilo.

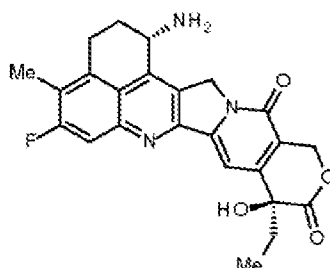
22. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 21, en donde uno o dos aminoácidos se eliminan del extremo carboxilo de una cadena pesada del mismo, preferentemente en donde se elimina un aminoácido de cada uno de los extremos carboxilo de ambas cadenas pesadas del mismo.

23. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 21 o 22, en donde un resto de prolina en el extremo carboxilo de una cadena pesada del mismo está además amidado.

24. Un conjugado de anticuerpo y fármaco que comprende el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y 21 a 23 conjugado con un fármaco, preferentemente en donde el fármaco es un compuesto antitumoral.

25. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 24, en donde el compuesto antitumoral es un compuesto antitumoral representado por la siguiente fórmula:

[Fórmula 1]



26. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con las reivindicaciones 24 o 25, en donde el anticuerpo está conjugado con el fármaco a través de un enlazador que tiene cualquier estructura seleccionada del grupo que consiste en las siguientes fórmulas (a) a (f):

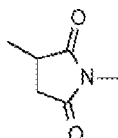
(a) -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,(b) -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-,(c) -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,(d) -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-,(e) -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-

y

(f) - (Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-, en donde el anticuerpo está conectado al extremo de - (Succinimid-3-il-N), el compuesto antitumoral está conectado al grupo carbonilo de la fracción -CH₂CH₂CH₂-C(=O)- de (a), (b), (e) o (f), la fracción CH₂-O-CH₂-C(=O)- de (c) o la fracción CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)- de (d) con el átomo de nitrógeno del grupo amino en la posición 1 como una posición de conexión, GGFG representa una secuencia de aminoácidos que consiste en glicina-glicina-fenilalanina-glicina enlazadas a través de enlaces peptídicos, y

-(Succinimid-3-il-N)- tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:

[Fórmula 2]



que está conectado al anticuerpo en la posición 3 del mismo y está conectado a un grupo metileno en la estructura enlazadora que contiene esta estructura en el átomo de nitrógeno en la posición 1.

27. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 26, en donde el enlazador está representado por cualquier fórmula seleccionada del grupo que consiste en las siguientes fórmulas (c), (d) y (e):

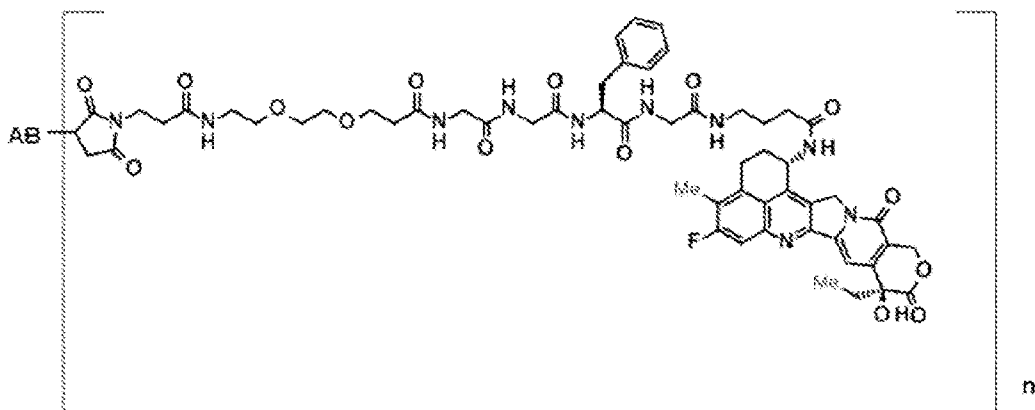
(c) -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-,

(d) -(Succinimid-3-il-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)- y

(e) - (Succinimid-3-il-N) -CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-, preferentemente en donde el enlazador está representado por las fórmulas (c) o (e).

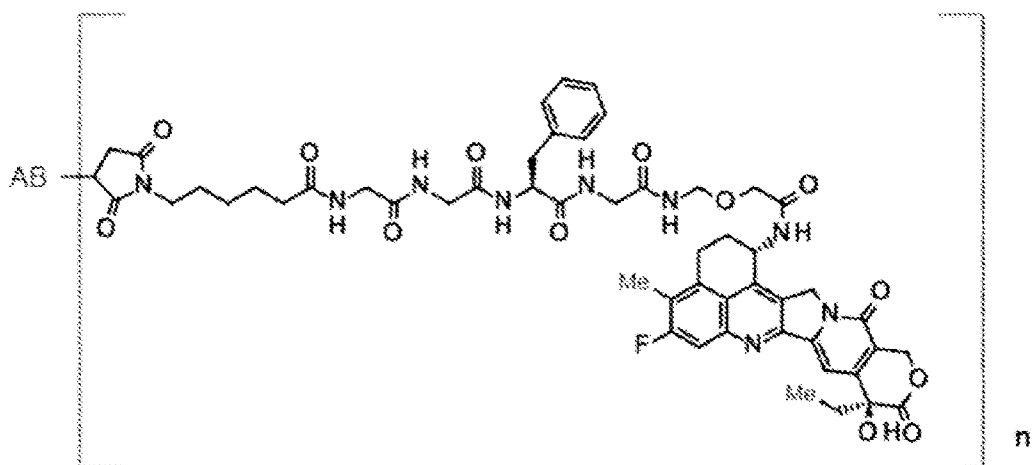
28. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, que tiene una estructura representada por una fórmula seleccionada del grupo que consiste en:

[Fórmula 3]



; y

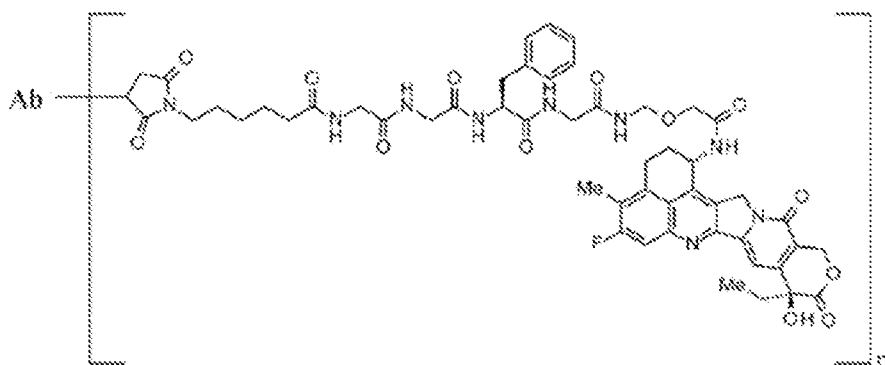
[Fórmula 4]



en donde AB representa el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo, n representa el número promedio de unidades de la estructura del enlazador del fármaco conjugada al anticuerpo por anticuerpo, y el anticuerpo está conectado al enlazador a través de un grupo sulfhidrilo derivado del anticuerpo.

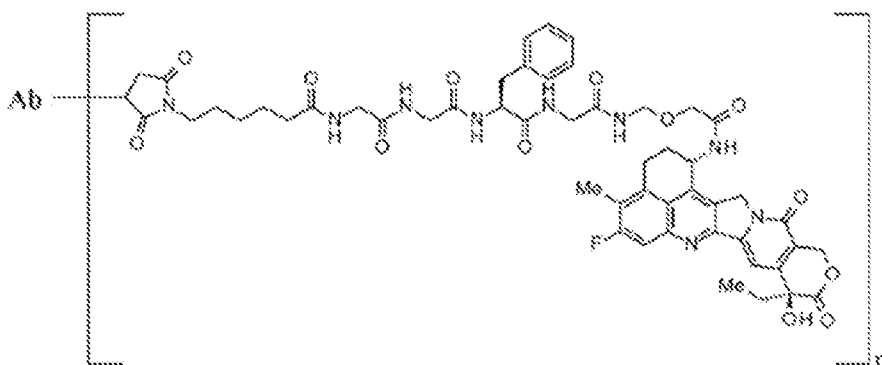
29. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 28, en donde el número promedio de unidades de la estructura de enlazador de fármaco seleccionada conjugadas por anticuerpo está en el intervalo de 1 a 10, preferentemente en el intervalo de 2 a 8, más preferentemente en el intervalo de 5 a 8, más preferentemente en el intervalo de 7 a 8.

30. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 29, que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



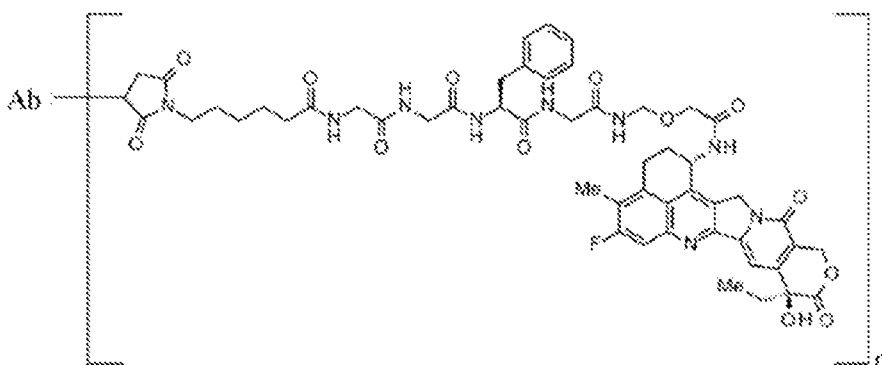
en donde Ab es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 71 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 63 y n representa el número promedio de unidades de la estructura del enlazador de fármaco conjugadas al anticuerpo por anticuerpo, en donde el número promedio de unidades de la estructura de enlazador de fármaco conjugadas por anticuerpo está en el intervalo de 7 a 8.

31. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 29, que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



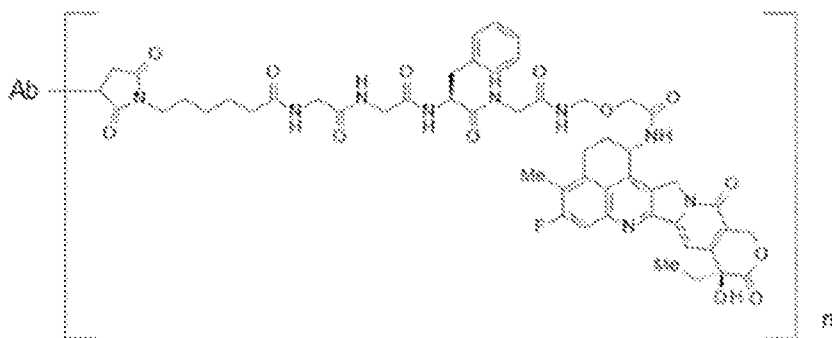
en donde Ab es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 75 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 63 y n representa el número promedio de unidades de la estructura del enlazador de fármaco conjugadas al anticuerpo por anticuerpo, en donde el número promedio de unidades de la estructura de enlazador de fármaco conjugadas por anticuerpo está en el intervalo de 7 a 8.

32. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 29, que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



en donde Ab es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 79 y una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 63 y n representa el número promedio de unidades de la estructura del enlazador de fármaco conjugadas al anticuerpo por anticuerpo, en donde el número promedio de unidades de la estructura de enlazador de fármaco conjugadas por anticuerpo está en el intervalo de 7 a 8.

33. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 29, que tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



en donde Ab es un anticuerpo que comprende una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 69 y una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61, n representa el número promedio de unidades de la estructura del enlazador de fármaco conjugadas al anticuerpo por anticuerpo, en donde el número promedio de unidades de la estructura de

enlazador de fármaco conjugadas por anticuerpo está en el intervalo de 7 a 8.

34. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 33, en donde se elimina un aminoácido de cada uno de los extremos carboxilo de ambas cadenas pesadas del anticuerpo del mismo.

35. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 29, en donde el anticuerpo es un anticuerpo que comprende una cadena ligera y una cadena pesada en una combinación cualquiera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes combinaciones (1) a (4), o un fragmento funcional del anticuerpo:

- (1) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 69,
- (2) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73,
- (3) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 65 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 73 y
- (4) una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 77.

36. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el anticuerpo es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en los siguientes:

- (1) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 69, o un fragmento funcional del anticuerpo; y
- (2) un anticuerpo que comprende una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 21 a 233 en SEQ ID NO: 61 y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 20 a 471 en SEQ ID NO: 77, o un fragmento funcional del anticuerpo.

37. El conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 36, en donde la cadena pesada o la cadena ligera han sido sometidas una o dos o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en glucosilación ligada a N, glucosilación ligada a O, procesamiento N-terminal, procesamiento C-terminal, desamidación, isomerización de ácido aspártico, oxidación de metionina, adición de un resto de metionina al extremo N, amidación de un resto de prolina, conversión de glutamina N-terminal o ácido glutámico N-terminal en ácido piroglutámico y una eliminación de uno o dos aminoácidos del extremo carboxilo.

38. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 37, una sal del mismo o un hidrato del conjugado o de la sal.

39. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 38, que es un fármaco antitumoral.

40. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 39, en donde el tumor es un tumor que expresa CDH6.

41. Un componente seleccionado del conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 37, una sal del mismo y un hidrato del conjugado o de la sal para su uso en el tratamiento de un tumor en un individuo.

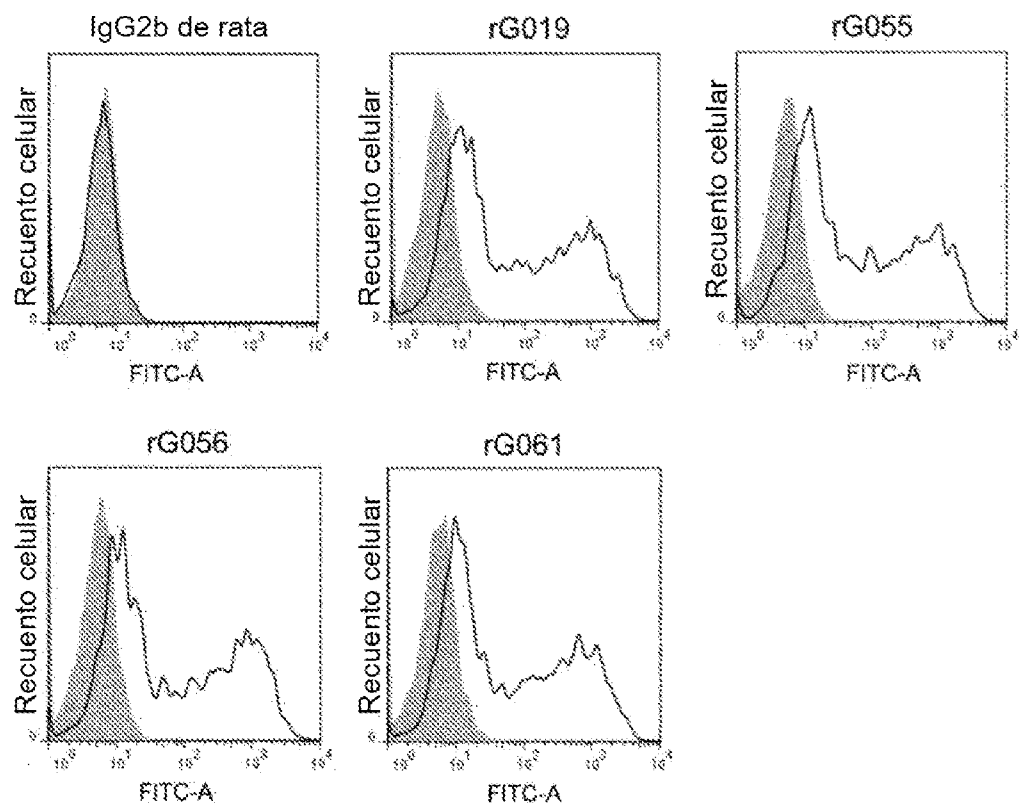
42. El componente para su uso de acuerdo con la reivindicación 41, en donde el tumor es un tumor que expresa CDH6.

43. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 38 a 40 o el componente para uso de acuerdo con las reivindicaciones 41 o 42, en donde el tumor es carcinoma de células renales, carcinoma renal de células claras, carcinoma de células renales papilares, cáncer de ovario, adenocarcinoma seroso de ovario, cáncer de tiroides, cáncer de las vías biliares, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón microcítico, glioblastoma, mesotelioma, cáncer uterino, cáncer pancreático, tumor de Wilms o neuroblastoma.

44. Una composición farmacéutica que comprende al menos un componente seleccionado del conjugado de anticuerpo y fármaco de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 24 a 37, una sal del mismo y un hidrato del conjugado o de la sal, para su uso en el tratamiento de un tumor en un individuo, en donde la composición farmacéutica se administra simultánea, separada o continuamente con al menos un fármaco antitumoral.

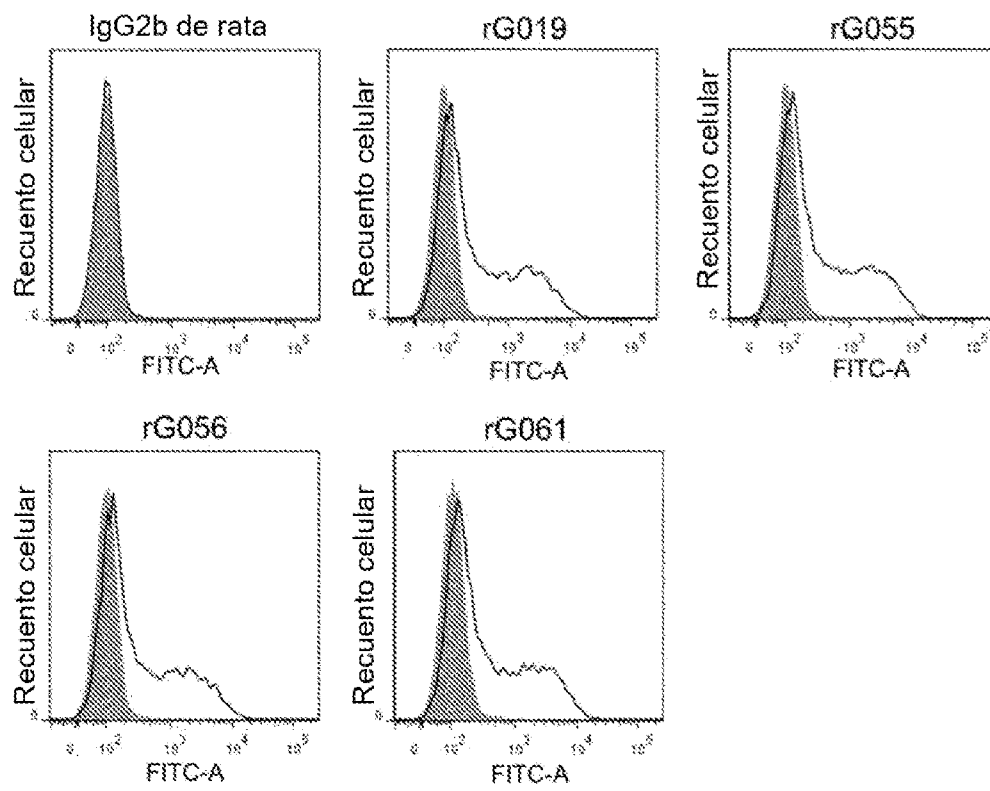
45. Un método para producir un conjugado de anticuerpo y fármaco, que comprende la etapa de hacer reaccionar el anticuerpo o el fragmento funcional del anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 y 21 a 23 o un anticuerpo o un fragmento funcional del anticuerpo obtenido mediante el método de producción de acuerdo con la reivindicación 20 con un compuesto intermedio enlazador de fármaco.

[Figura 1]



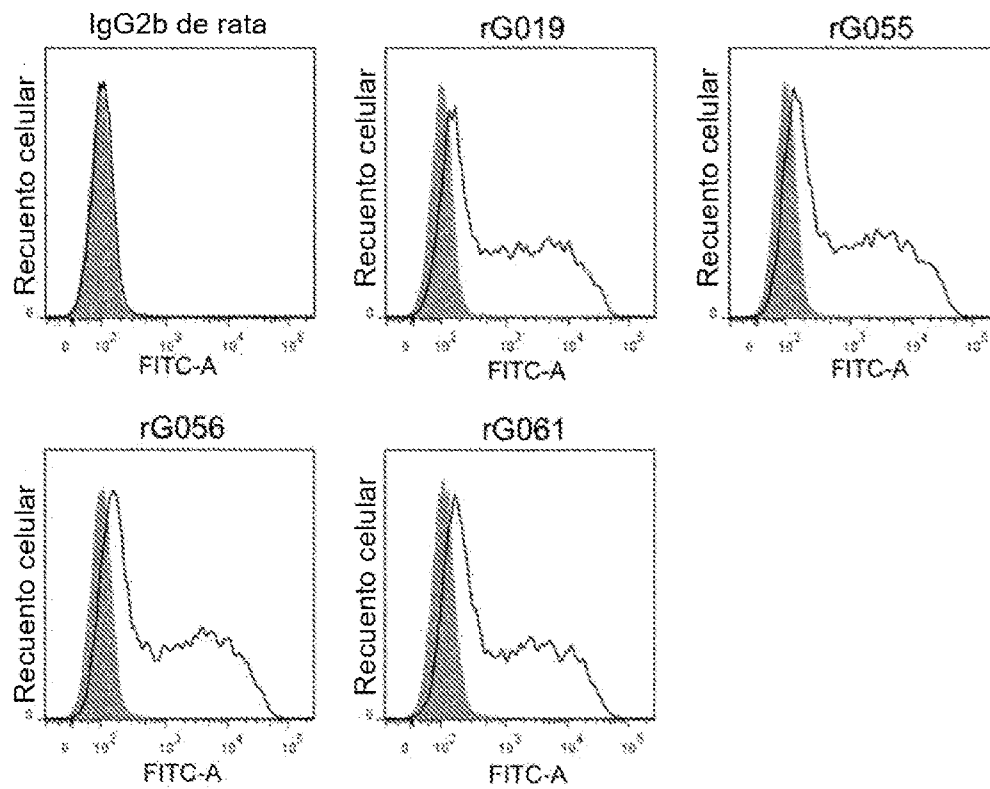
[Figura 2-1]

(1) Célula control o célula transfectada con hCDH6 de longitud completa



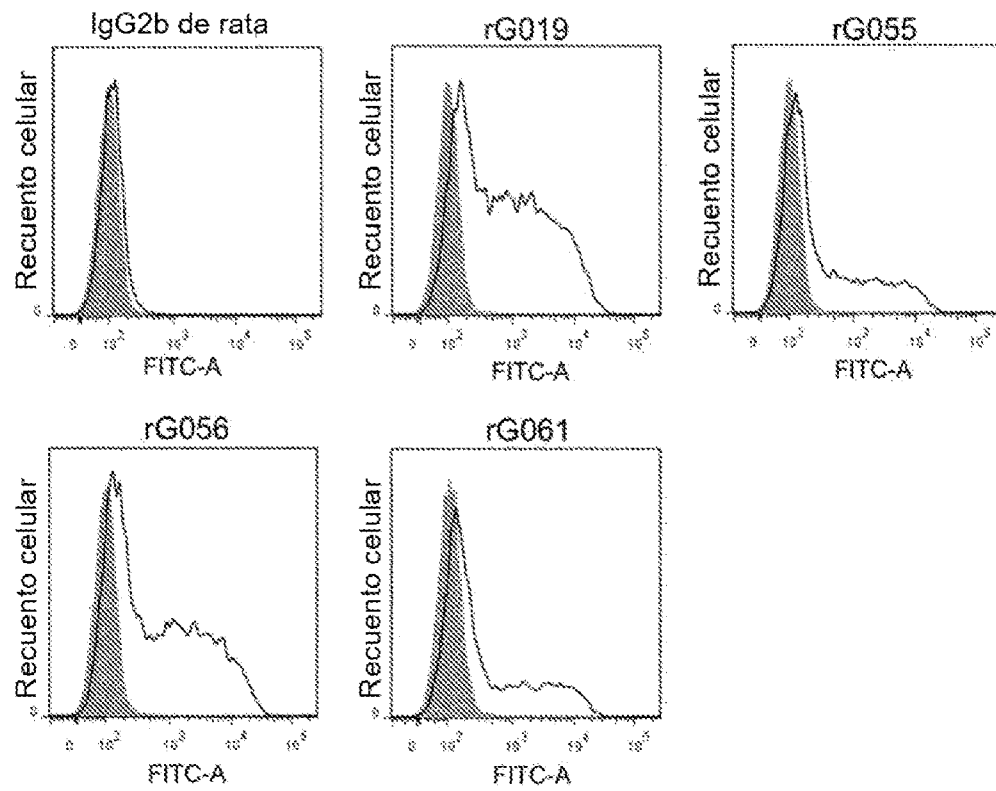
[Figura 2-2]

(2) Célula control o célula transfectada con hCDH6 con EC1 eliminado



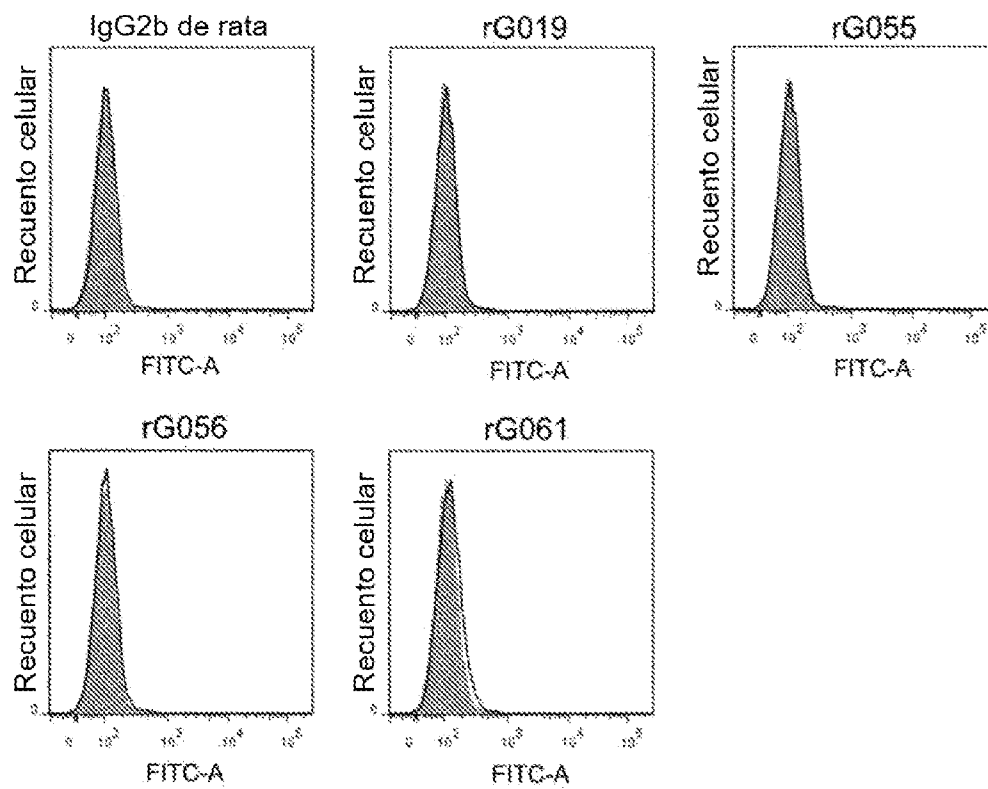
[Figura 2-3]

(3) Célula control o célula transfectada con hCDH6 con EC2 eliminado



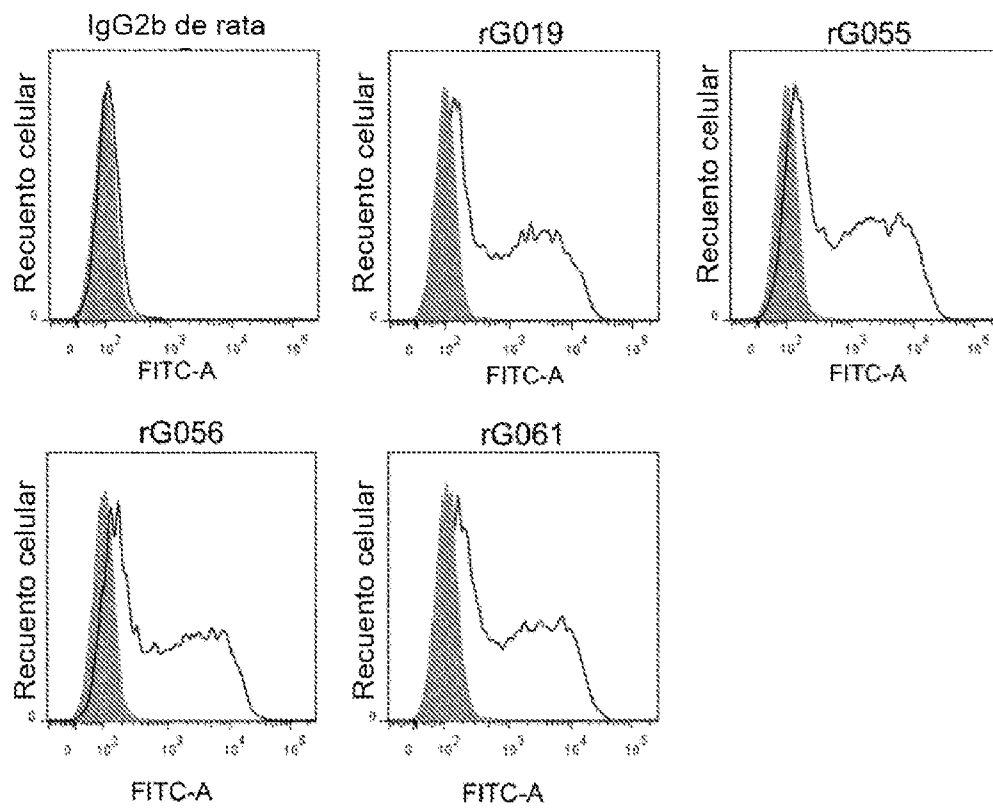
[Figura 2-4]

(4) Célula control o célula transfectada con hCDH6 con EC3 eliminado



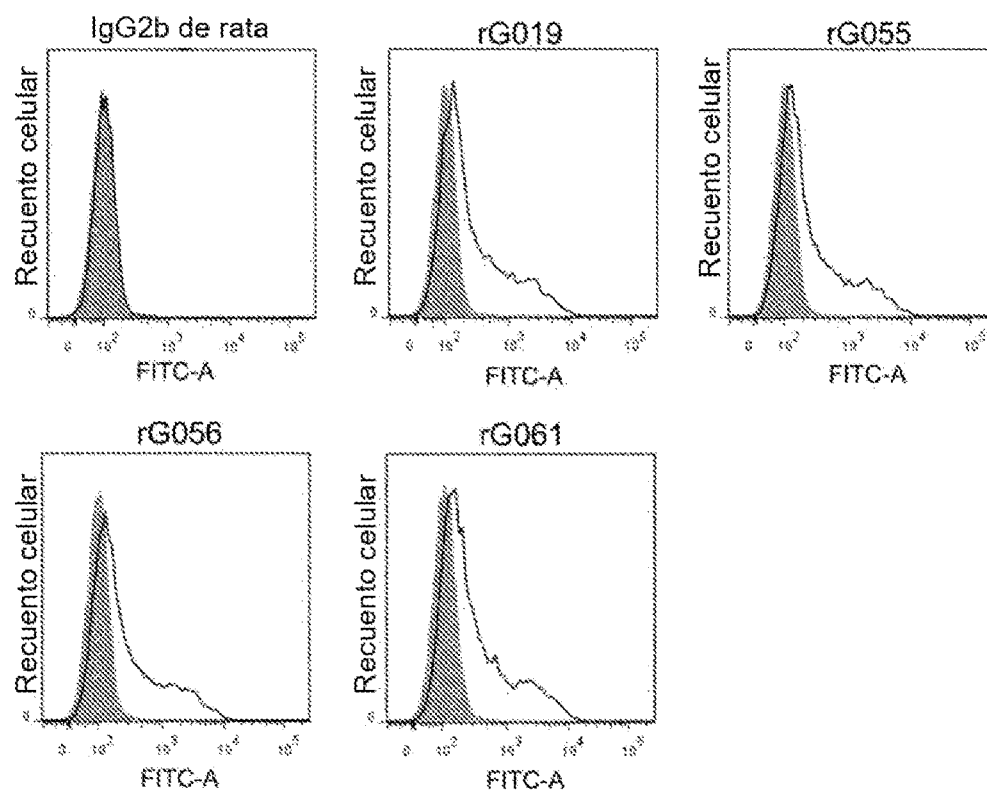
[Figura 2-5]

(5) Célula control o célula transfectada con hCDH6 con EC4 eliminado

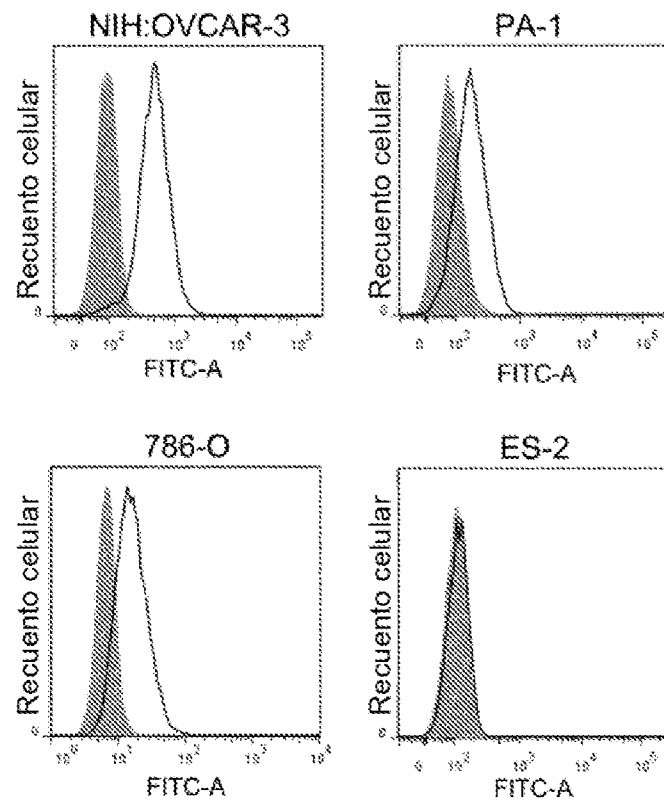


[Figura 2-6]

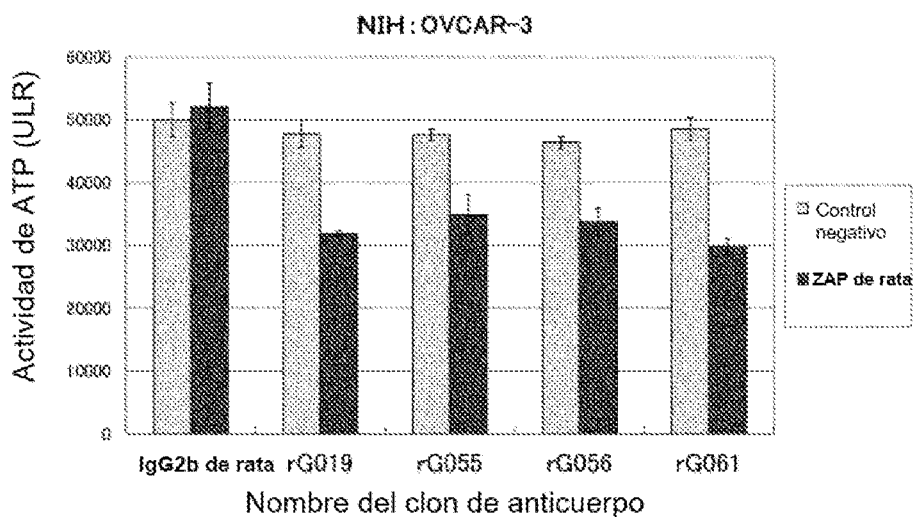
(6) Célula control o célula transfectada con hCDH6 con EC5 eliminado



[Figura 3]

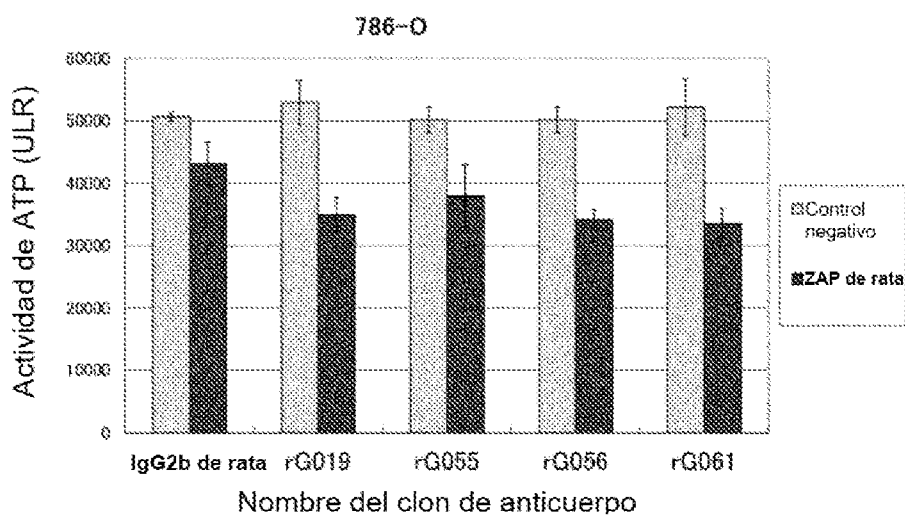


[Figura 4]



Tasa de supervivencia celular NIH-OVCAR-3 usando Zap de rata (%)

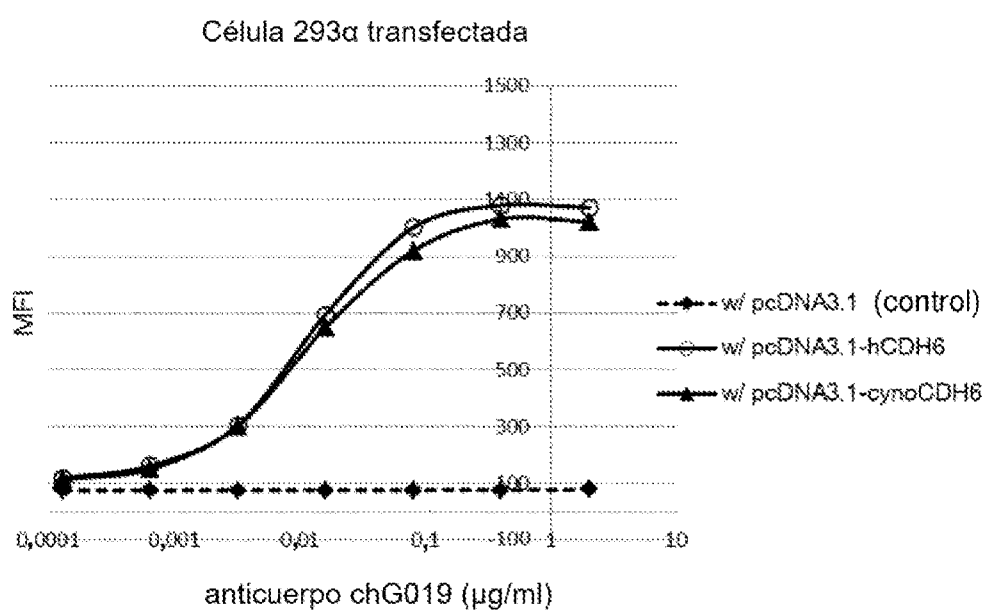
IgG2b de rata	rG019	rG055	rG056	rG061
104,1	66,8	73,3	72,8	61,2



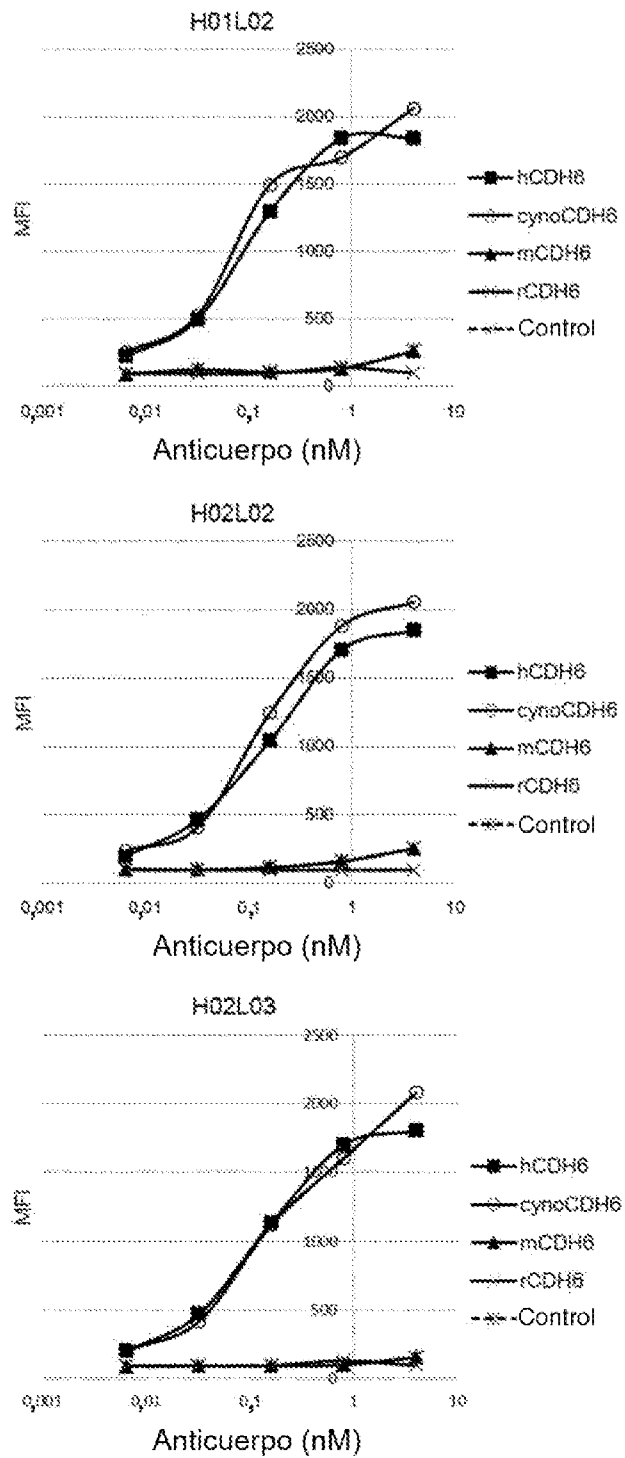
Tasa de supervivencia celular 786-O usando Zap de rata (%)

IgG2b de rata	rG019	rG055	rG056	rG061
85,2	66,1	75,7	68,1	64,2

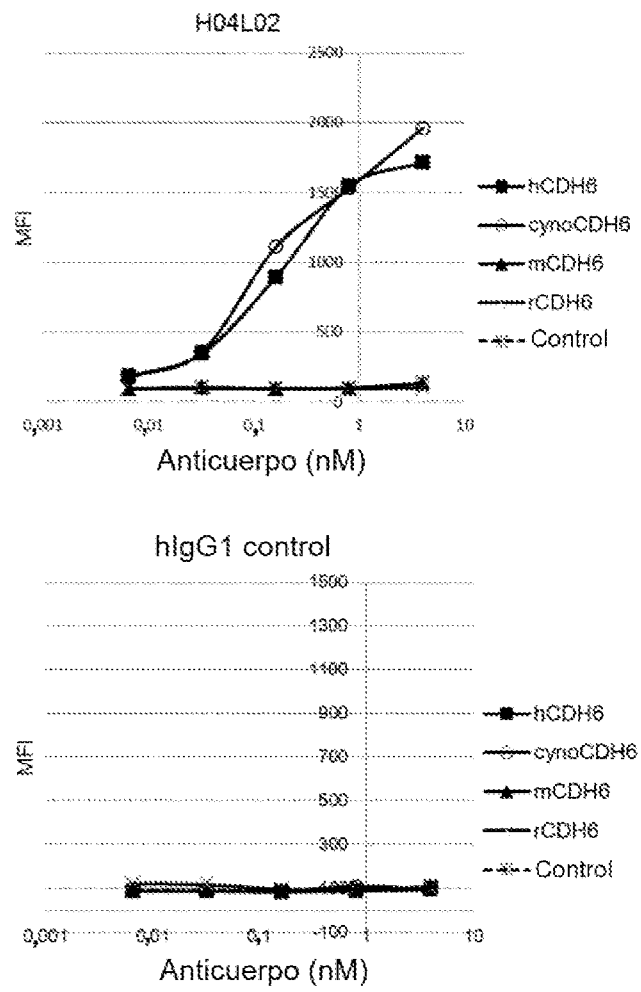
[Figura 5]



[Figura 6-1]

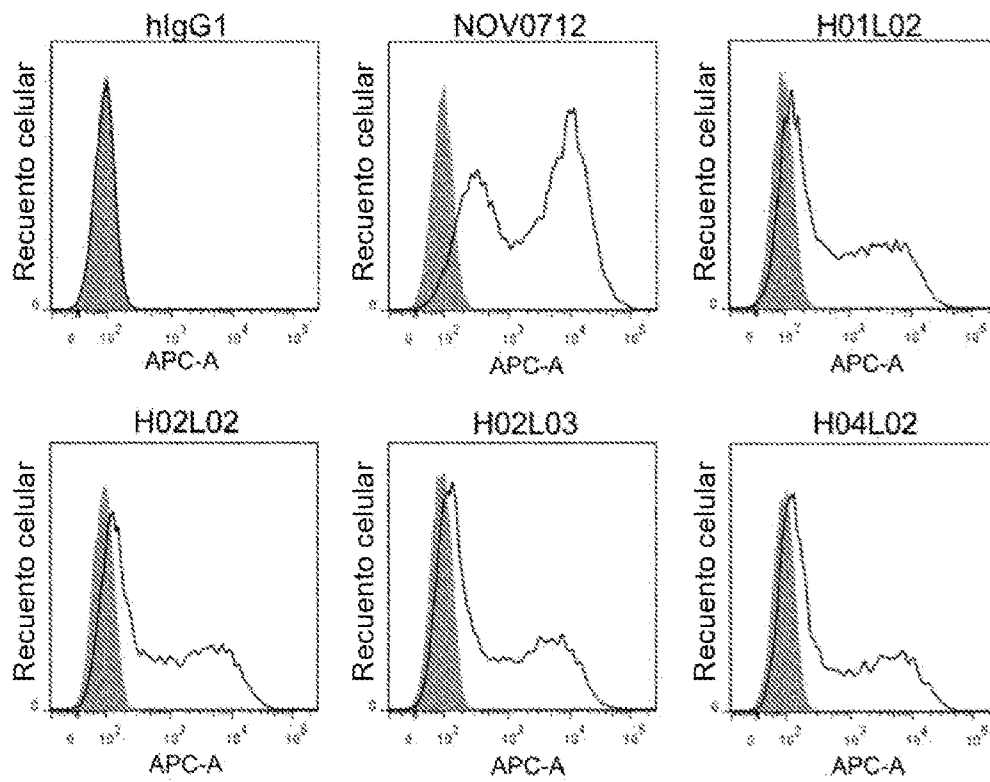


[Figura 6-2]



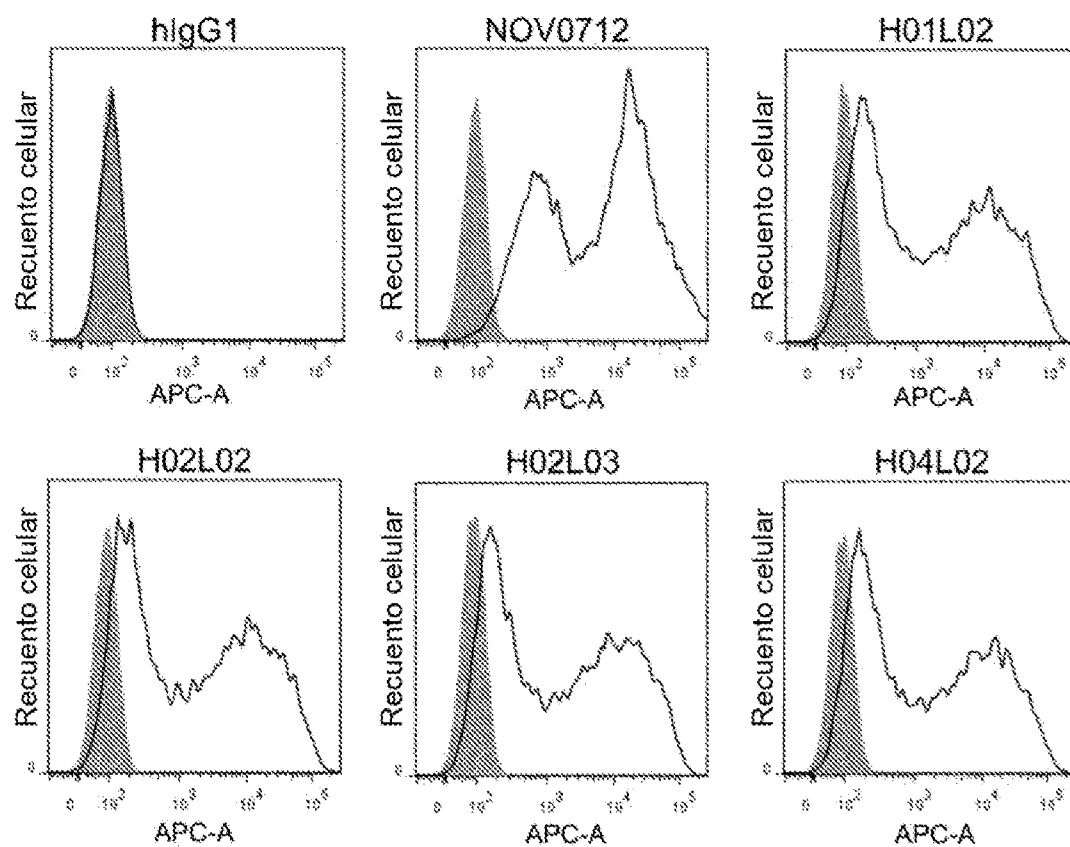
[Figura 7-1]

(1) Célula control o célula transfectada con hCDH6 de longitud completa



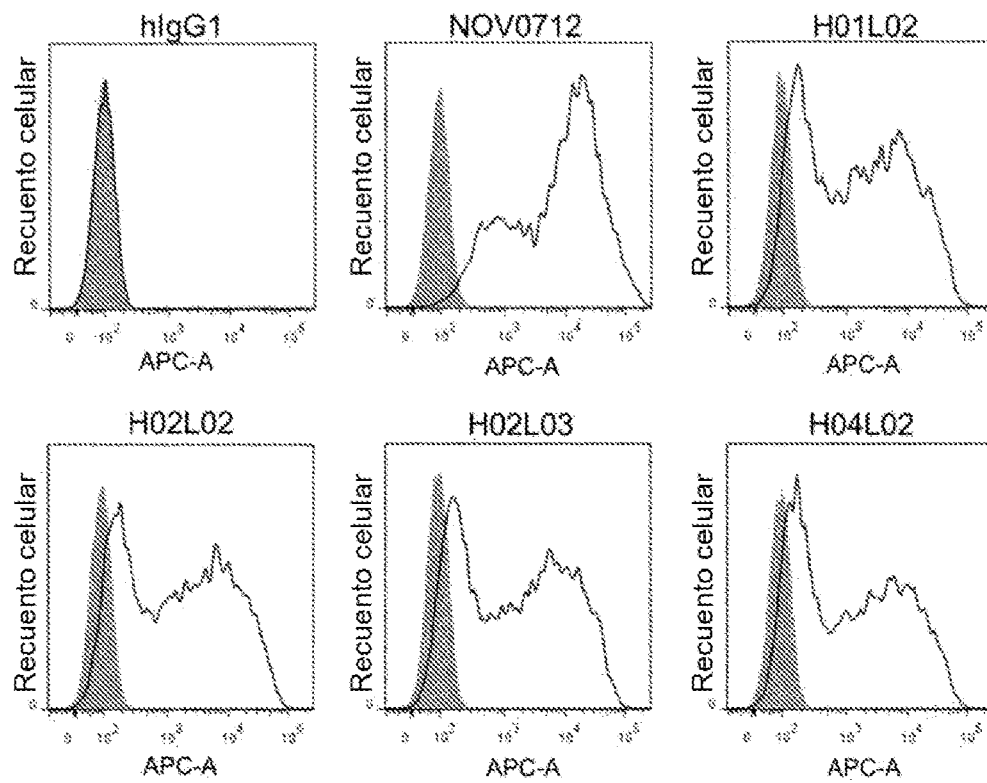
[Figura 7-2]

(2) Célula control o célula transfectada con hCDH6 con EC1 eliminado



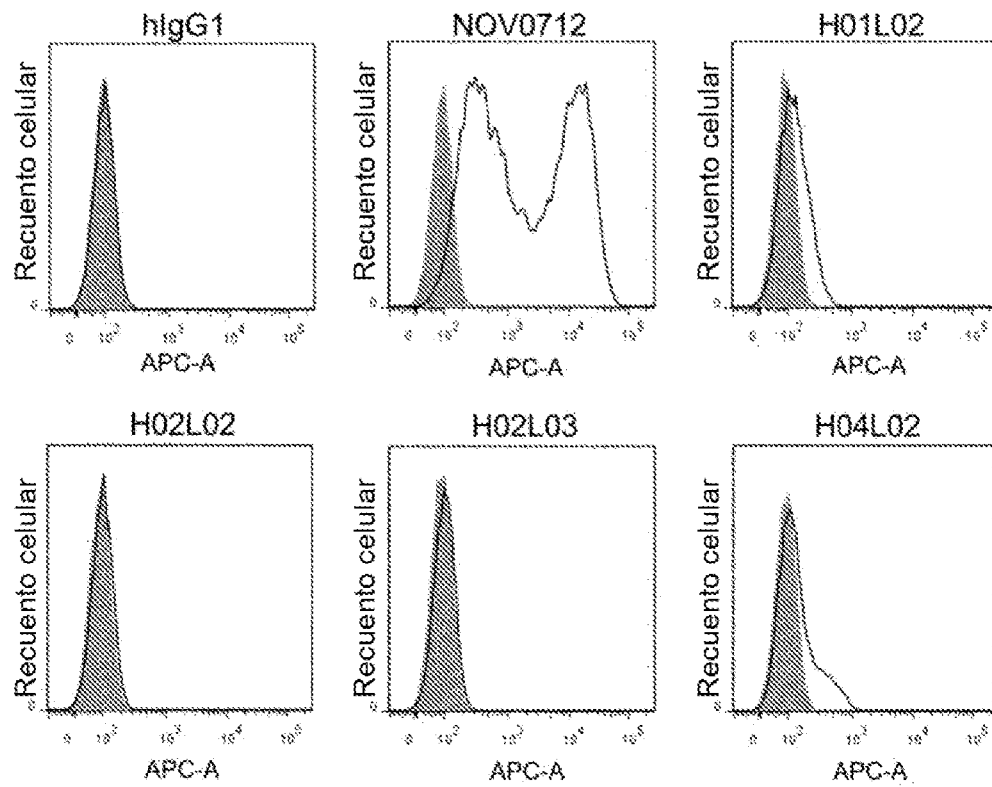
[Figura 7-3]

(3) Célula control o célula transfectada con hCDH6 con EC2 eliminado



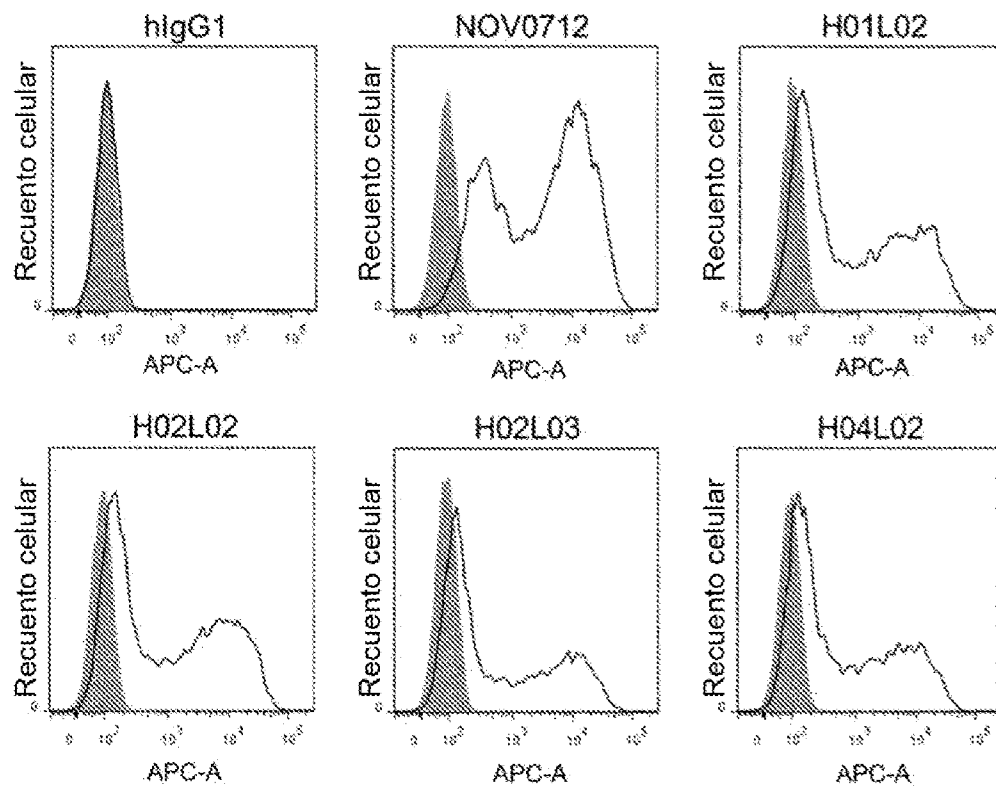
[Figura 7-4]

(4) Célula control o célula transfectada con hCDH6 con EC3 eliminado



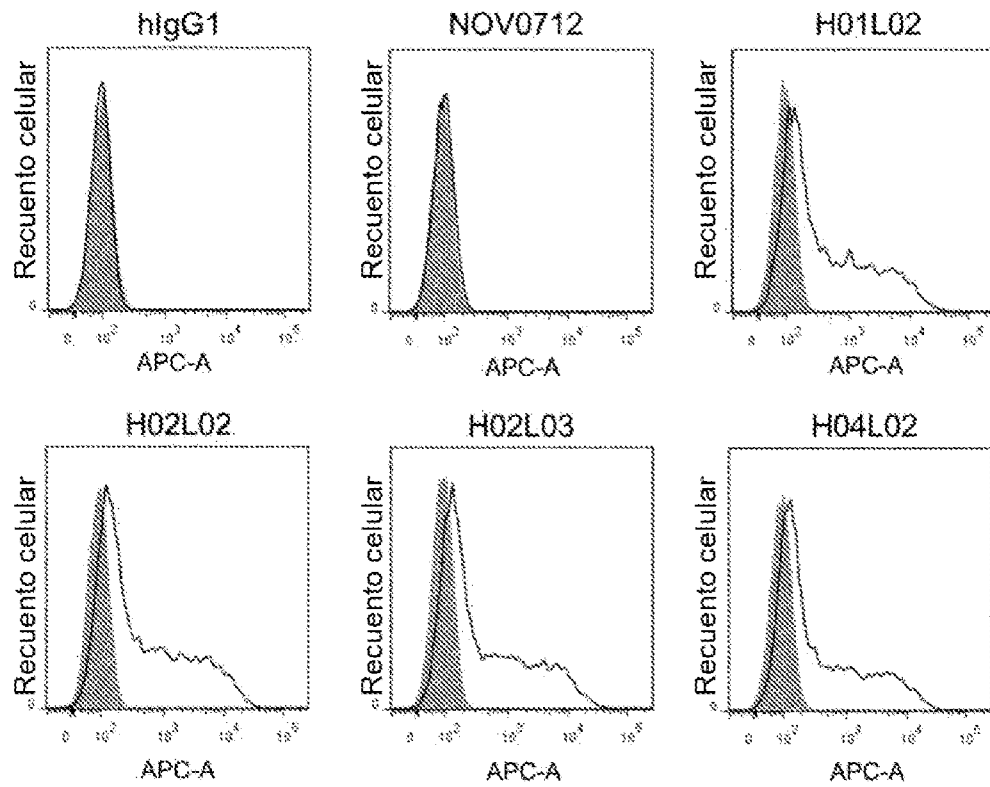
[Figura7-5]

(5) Célula control o célula transfectada con hCDH6 con EC4 eliminado

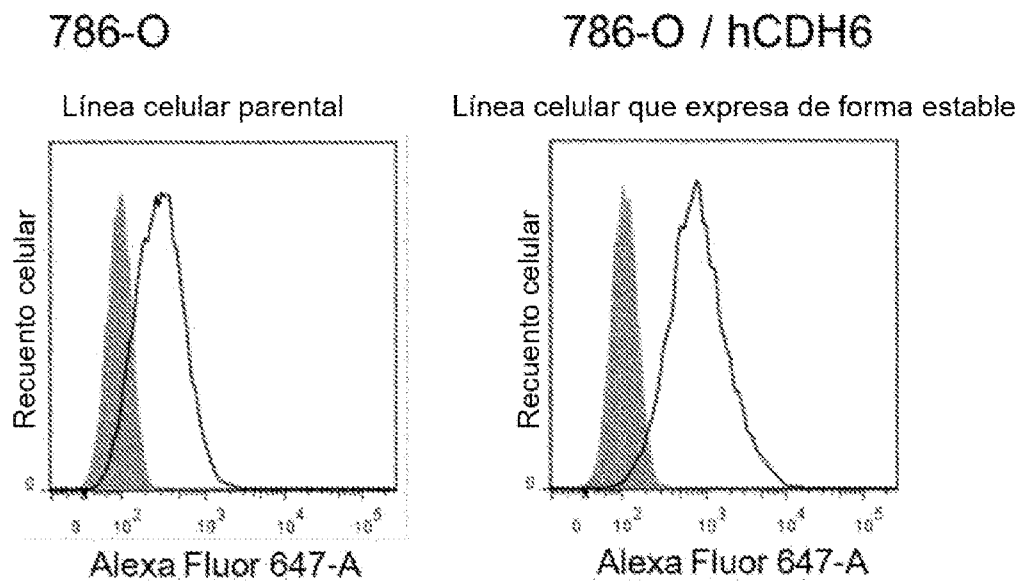


[Figura 7-6]

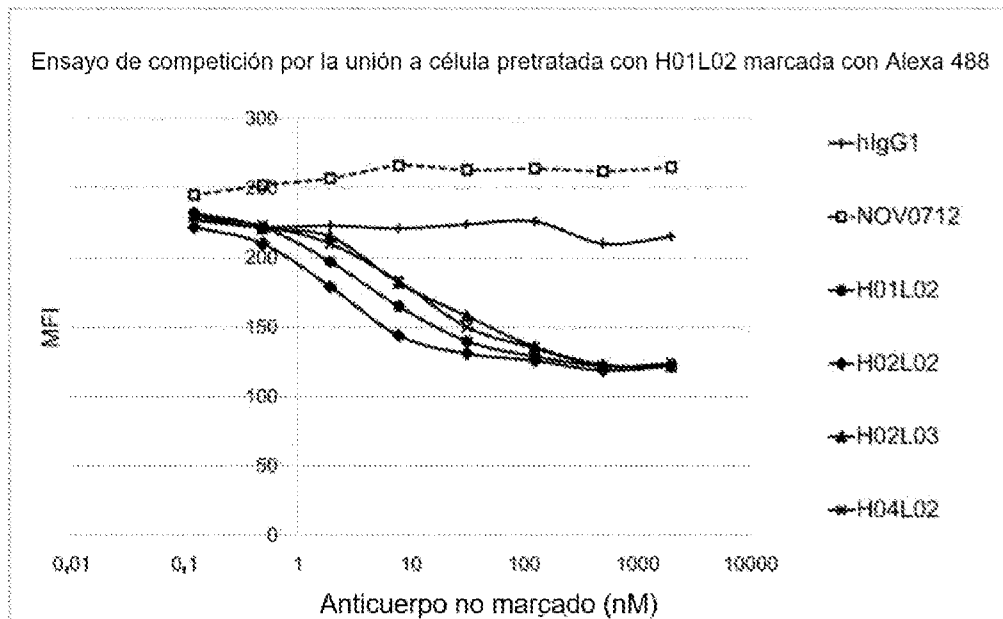
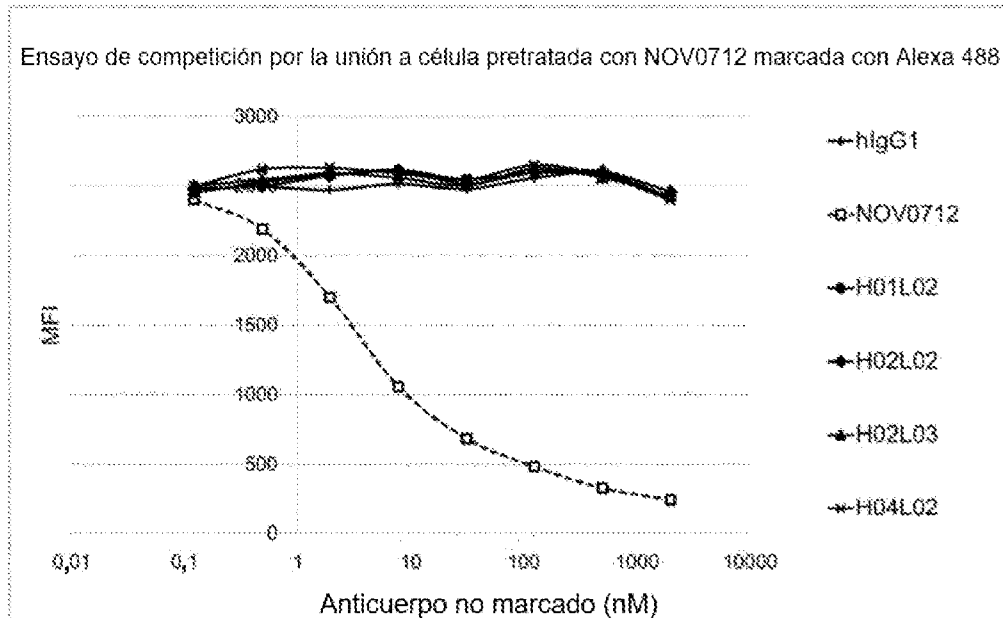
(6) Célula control o célula transfectada con hCDH6 con EC5 eliminado



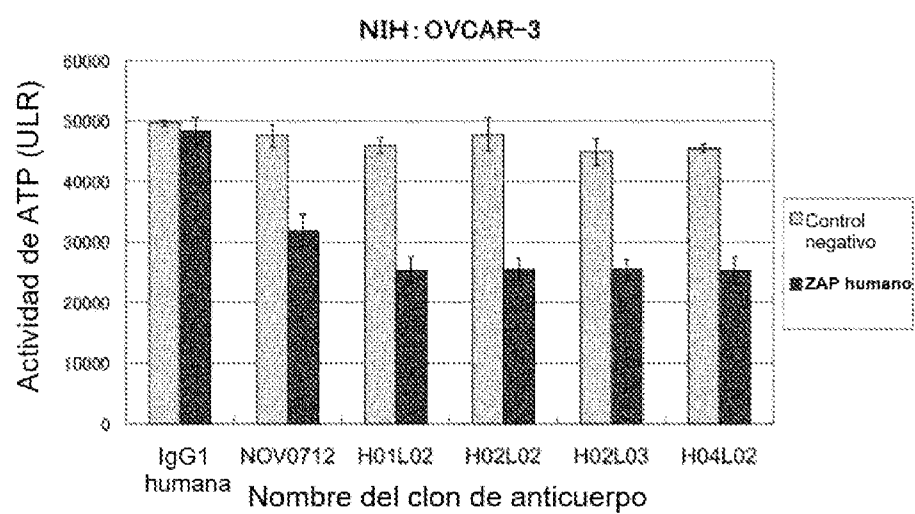
[Figura 8]



[Figura 9]



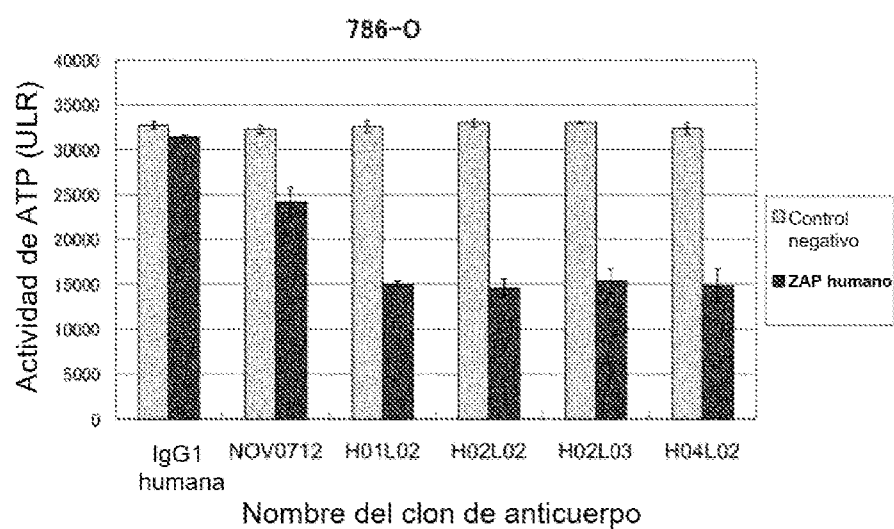
[Figura 10-1]



Tasa de supervivencia celular NIH-OVCAR-3 usando ZAP humano (%)

IgG1 humana	NOV0712	H01L02	H02L02	H02L03	H04L02
97,3	67,0	55,1	53,1	56,7	55,6

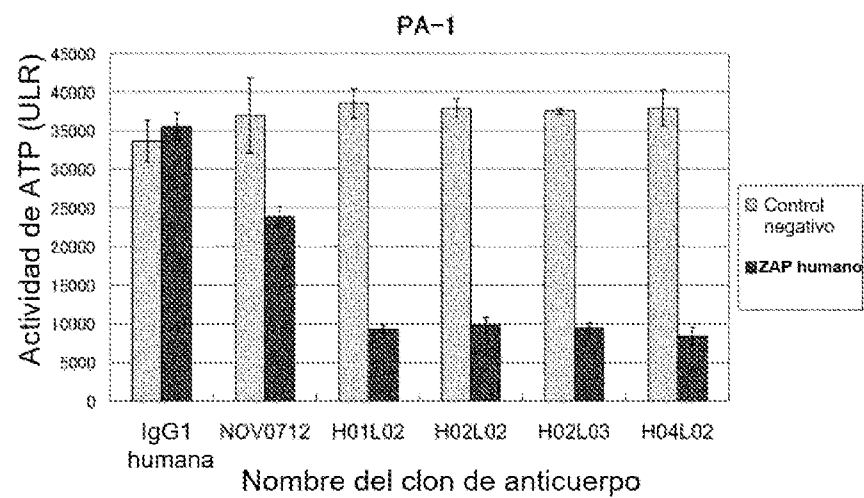
[Figura 10-2]



Tasa de supervivencia celular 786-O usando ZAP humano (%)

IgG1 humana	NOV0712	H01L02	H02L02	H02L03	H04L02
95,9	74,8	46,0	44,1	46,5	45,9

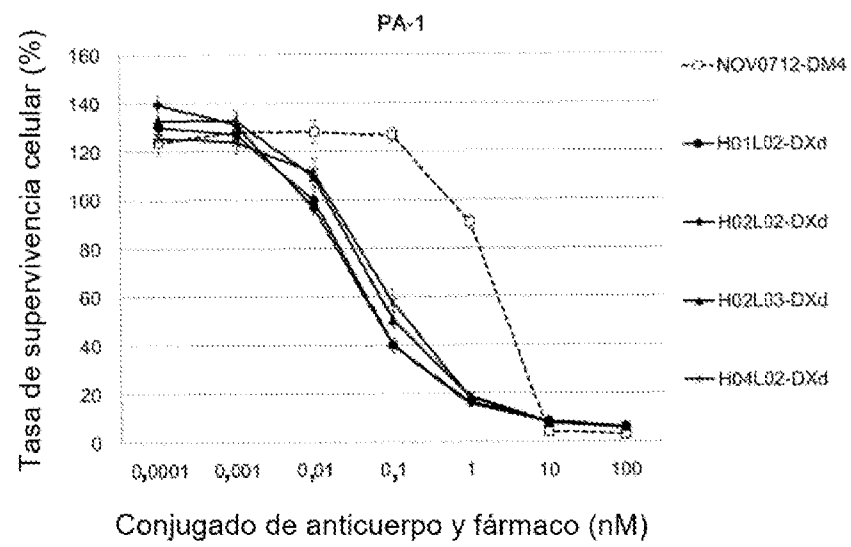
[Figura 10-3]



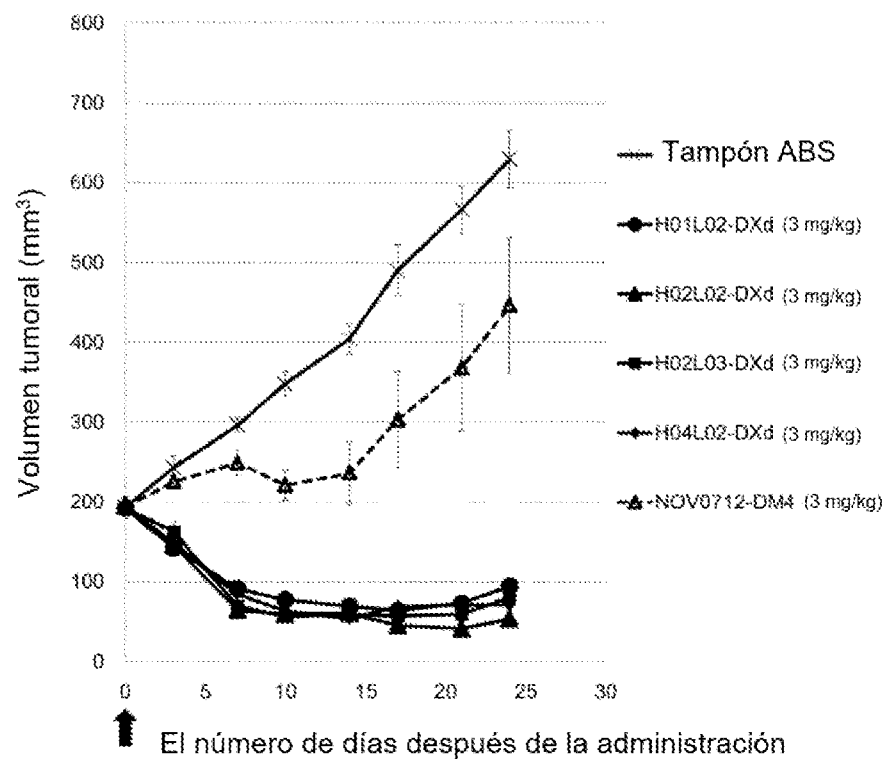
Tasa de supervivencia celular PA-1 usando ZAP humano (%)

IgG1 humana	NOV0712	H01L02	H02L02	H02L03	H04L02
105,6	64,5	24,3	25,8	25,1	22,2

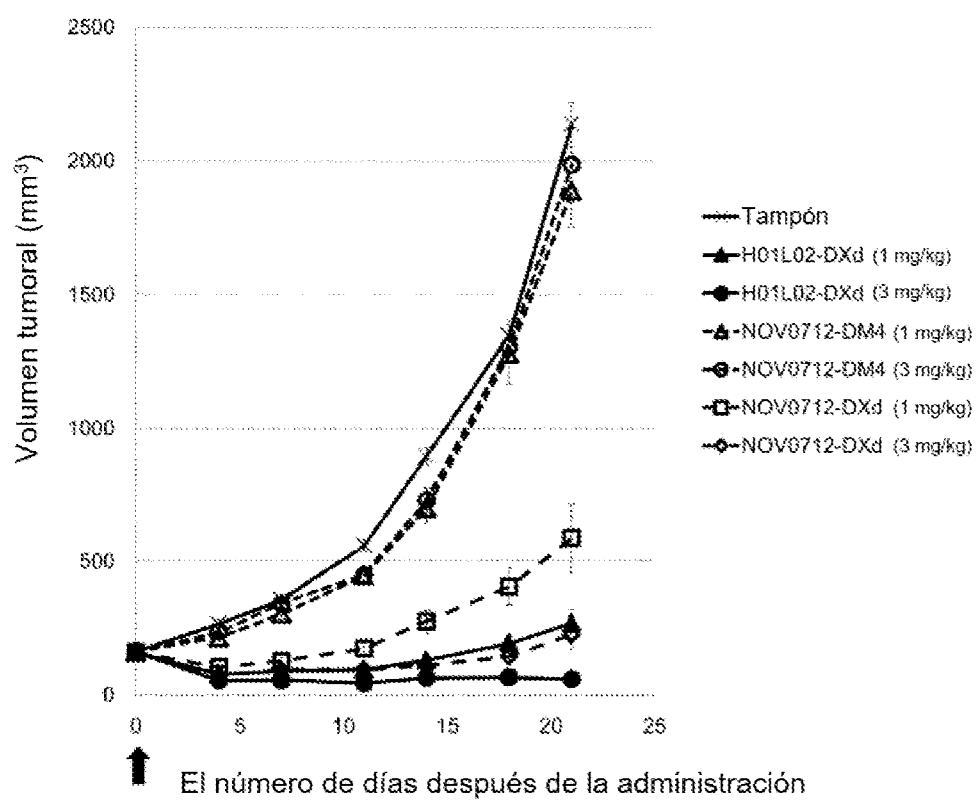
[Figura 11]



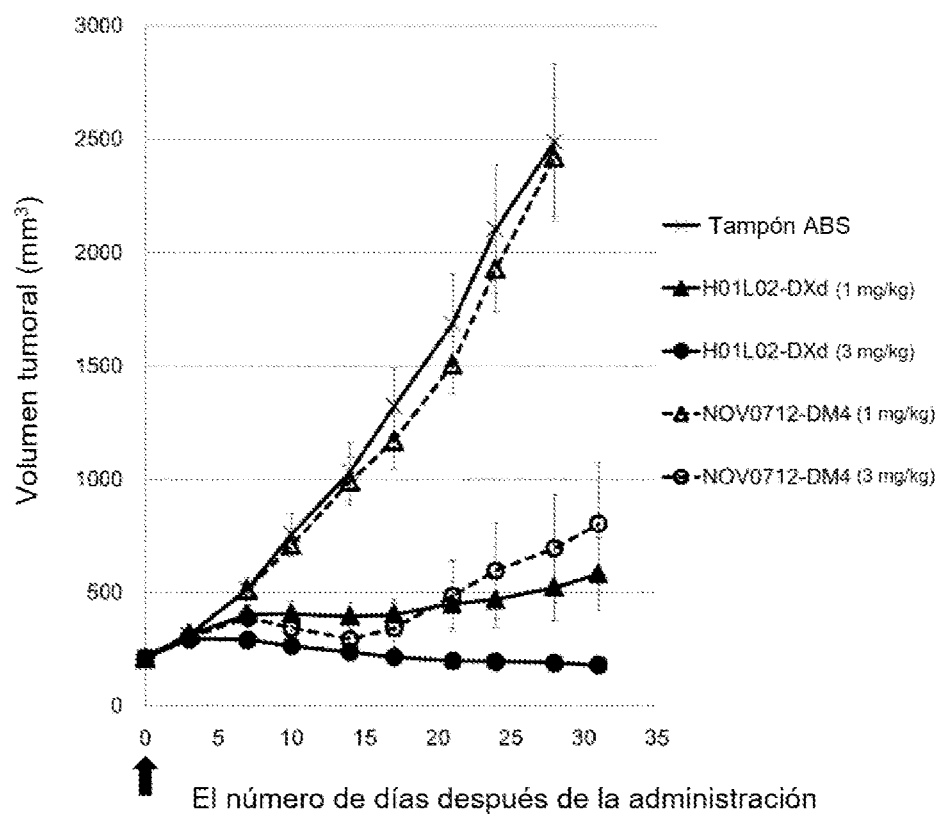
[Figura 12]



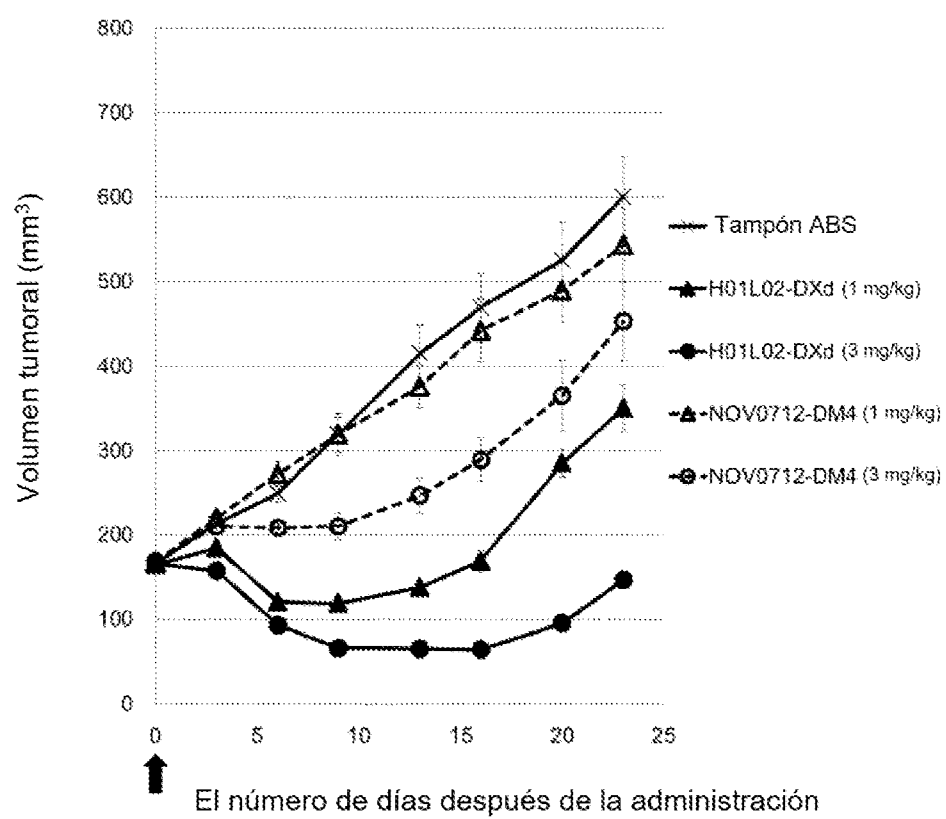
[Figura 13]



[Figura 14]



[Figura 15]



[Figura 16]

