

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 026 749**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2007.01)  
**A61K 31/505** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2018** **E 23175804 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2025** **EP 4257614**

54 Título: **Combinaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo ANTI-LY75**

30 Prioridad:

**10.03.2017 GB 201703876**

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

**12.06.2025**

73 Titular/es:

**BERLIN-CHEMIE AG (100.00%)**  
**Glienicker Weg 125-127**  
**12489 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**BINASCHI, MONICA;**  
**BIGIONI, MARIO;**  
**MERLINO, GIUSEPPE;**  
**SIMONELLI, CECILIA;**  
**PELLACANI, ANDREA y**  
**BERTONI, FRANCESCO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

### Observaciones:

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

ES 3 026 749 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

Combinaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo ANTI-LY75

## Introducción

La presente exposición se refiere de manera general a los campos de la inmunología y la biología molecular. Más específicamente, en la presente memoria se proporcionan combinaciones farmacéuticas que comprenden (A) anticuerpos, o partes de unión a antígeno de los mismos, con diana en LY75, y (B) ibrutinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para la utilización en el tratamiento de linfoma de células B grandes difusas (LCBGD) o linfoma no Hodgkin.

## Antecedentes

Las leucemias y linfomas pertenecen a un amplio grupo de tumores que afectan a la sangre, médula ósea y sistema linfóide; estos se conocen como tumores de los tejidos hematopoyéticos y linfoides.

El linfoma es un grupo de tumores de células sanguíneas que se desarrollan a partir de linfocitos. Entre los signos y síntomas pueden incluirse ganglios linfáticos agrandados, fiebre, sudoraciones profusas, pérdida de peso no intencionada, picor y sensación constante de fatiga. Existen varios subtipos de linfoma: las dos categorías principales de linfoma son los linfomas de Hodgkin (LH) y los linfomas no Hodgkin (LNH). La Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye dos categorías adicionales como tipos de linfoma: el mieloma múltiple y las enfermedades inmunoproliferativas. Aproximadamente el 90 % de los linfomas son linfomas no Hodgkin.

La leucemia es un grupo de cánceres que normalmente se inician en la médula ósea y resultan en un número elevado de glóbulos blancos anormales. Entre los síntomas pueden incluirse problemas de sangrado y hematomas, sensación de cansancio, fiebre y un riesgo incrementado de infecciones. Estos síntomas se producen debido a la falta de glóbulos blancos. El diagnóstico se lleva a cabo normalmente mediante análisis de sangre o biopsia de la médula ósea. Existen cuatro tipos principales de leucemia: leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC) y leucemia mieloide crónica (LMC), así como varios tipos menos comunes.

El tratamiento de las leucemias y linfomas puede implicar una o más de quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida y cirugía (y trasplante de médula ósea en el caso de las leucemias). El éxito del tratamiento de la leucemia depende del tipo de leucemia y de la edad del paciente. El resultado del tratamiento del linfoma depende del subtipo: algunos son curables y el tratamiento prolonga la supervivencia en la mayoría de ellos.

Hasta ahora se han utilizado varios agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de las leucemias, incluyendo prednisona, vincristina, antraciclinas, L-asparaginasa, ciclofosfamida, metotrexato, 6-mercaptopurina, fludarabina, pentostatina y cladribina. Entre los agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de linfomas se incluyen ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina (también conocida como doxorubicina o adriamicina), Oncovin (vincristina), prednisona, prednisolona, bleomicina, dacarbazina, etopósido y procarbazona.

La quimioterapia de combinación implica tratar al paciente con dos o más fármacos diferentes simultáneamente. Los fármacos pueden diferir en su mecanismo y efectos secundarios. La mayor ventaja de ello es que se minimizan las probabilidades de que se desarrolle resistencia a cualquier agente. Además, los fármacos con frecuencia pueden utilizarse a dosis más bajas, reduciendo la toxicidad. Entre las terapias de combinación para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin se incluyen MOPP (mustina, vincristina, procarbazona y prednisolona) y ABVD (doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina). Entre las terapias de combinación para el tratamiento del linfoma no Hodgkin se incluyen CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona). Dado el número de fármacos que se conocen para el tratamiento de las leucemias y linfomas, el número de permutaciones y combinaciones de posibles terapias farmacológicas es claramente grande. Además, las terapias de combinación anteriormente mencionadas no incluyen anticuerpos.

Sin embargo, sigue existiendo una necesidad de nuevos tratamientos de las leucemias y linfomas, y particularmente para terapias de combinación eficaces.

El antígeno linfocitario 75 actúa como un receptor endocítico para dirigir los antígenos capturados del espacio extracelular a un compartimento de procesamiento de antígenos especializado y se cree que provoca una reducción en la proliferación de linfocitos B. Se ha observado la expresión del antígeno linfocitario 75 en los cánceres pancreático, ovárico, mamario, colorrectal, esofágico, cutáneo, tiroideo y pulmonar (no microcítico), así como en el mieloma múltiple y en muchos subtipos diferentes de linfomas y leucemias. El documento n.º WO2009/061996 da a conocer anticuerpos monoclonales aislados que se unen a DEC-205 humano (LY75) y composiciones basadas en anticuerpos y moléculas relacionados. Se dan a conocer, además, composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos, así como métodos terapéuticos y diagnósticos para la utilización de los anticuerpos. El documento n.º WO 2008/104806 da a conocer reactivos de afinidad capaces de unirse a LY75 para la utilización en el tratamiento o profilaxis de cáncer. El

documento n.º WO2015/052537 da a conocer anticuerpos aislados específicos capaces de unirse a LY75 y a su utilización en el tratamiento de diversos cánceres.

El ibrutinib (Imbruvica) es un fármaco de molécula pequeña que se une irreversiblemente a la tirosina quinasa de Bruton (BTK, por sus siglas en inglés), que es importante en las células B. El ibrutinib ha sido utilizado anteriormente para tratar cánceres de células B, tales como el linfoma de células del manto, la leucemia linfocítica crónica y la macroglobulinemia de Waldenström.

Ahora se ha encontrado que combinaciones de determinados anticuerpos anti-LY75 con ibrutinib muestran resultados sinérgicos en el tratamiento de linfomas.

Rosalba Camicia et al., Molecular Cancer, vol. 15, n.º 7, 1 de diciembre de 2015, revisan nuevas dianas farmacológicas para medicina de precisión personalizada en el linfoma de células B grandes difusas en recaída/refractario.

Young R.M. et al., Nature Medicine, Nature Pub. Co., New York, vol. 52, n.º 8, 1 de abril de 2015, informa de la señalización de receptores de células B en el linfoma de células B grandes difusas.

Paul Juliane et al., Cancer Cell, Cell Press, US, vol. 31, n.º 1, 9 de enero de 2017, informa de que la inhibición simultánea de PI3K[delta] y PI3K[alfa] induce la regresión del LCBGD-CBA mediante el bloqueo de la activación dependiente e independiente de BCR de NF-[kappa]B y AKT.

#### Breve resumen de la invención

En un aspecto, la invención proporciona una combinación farmacéutica que comprende:

(A) un anticuerpo anti-LY75, o una parte de antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo o parte comprende:

a) una región variable de cadena pesada que comprende:

- i) una primera CDRvh que comprende la SEQ ID NO: 5,
- ii) una segunda CDRvh que comprende la SEQ ID NO: 6, y
- iii) una tercera CDRvh que comprende la SEQ ID NO: 7, y

b) una región variable de cadena ligera que comprende:

- i) una primera CDRvl que comprende la SEQ ID NO: 8,
- ii) una segunda CDRvl que comprende la SEQ ID NO: 9, y
- iii) una tercera CDRvl que comprende la SEQ ID NO: 10,

en la que el anticuerpo anti-LY75 o parte de unión a antígeno del mismo comprende, además, una fracción unida covalentemente, y en la que dicha fracción es un maitansinoide, y

(B) ibrutinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en la que la combinación farmacéutica se encuentra en la forma de una preparación combinada para la utilización simultánea, separada o secuencial y en la que la combinación farmacéutica es para la utilización en el tratamiento del linfoma de células B grandes difusas (LCBGD) o linfoma no Hodgkin.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-LY75 se unen a LY75 (SEQ ID NO: 15) y son capaces de ser internalizados por una célula que expresa LY75.

El anticuerpo anti-LY75 comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) o regiones variables (VR, por sus siglas en inglés) de cadena pesada y ligera del anticuerpo particular descrito en la presente memoria (p. ej., denominado en la presente memoria "LY75\_A1"). El anticuerpo anti-LY75 comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo LY75\_A1 que presenta la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera (VL) de LY75\_A1 que presenta la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2.

En otra realización, los anticuerpos anti-LY75 se unen a LY75 humano e incluyen una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 1. El anticuerpo puede incluir, además, una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 2.

En una realización, el anticuerpo anti-LY75 es tal como se define en la reivindicación 1 y comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 1 o una secuencia que es por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % idéntica a SEQ ID NO: 1. En otra

realización, el anticuerpo anti-LY75 es tal como se define en la reivindicación 1 y comprende una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 2 o una secuencia que es por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2. En otra realización, el anticuerpo anti-LY75 es tal como se define en la reivindicación 1 y comprende una región de marco de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % idéntica al marco de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1 tal como se muestra en las SEQ ID NO: 16, 17, 18 y 19. En otra realización, el anticuerpo anti-LY75 es tal como se define en la reivindicación 1 y comprende una región de marco de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % idéntica al marco de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 2, tal como se muestra en las SEQ ID NO: 20, 21, 22 y 23.

Todos los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria pueden ser de longitud completa, por ejemplo, cualquiera de los isotipos siguientes: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser fragmentos, tales como una parte de unión a antígeno o un anticuerpo de cadena sencilla (p. ej., un fragmento Fab, F(ab')<sub>2</sub> o un Fv de cadena sencilla).

Los anticuerpos pueden ser de cualquier tipo de anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos humanos, humanizados y quiméricos.

Los anticuerpos anti-LY75 se encuentran en la forma de un inmunoconjugado, es decir, incluyen, además, una fracción unida covalentemente. La fracción es un maitansinoide. En una realización preferente, la fracción es DM1 o DM4.

En una realización, el anticuerpo anti-LY75 comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera codificadas por secuencias de ácidos nucleicos que comprenden las SEQ ID NO: 3 y 4, respectivamente.

La combinación farmacéutica de la invención es para la utilización en el tratamiento del LCBGD o linfoma no Hodgkin.

Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente y reivindicaciones.

### Breve descripción de los dibujos

Solo la figura 8 se refiere a realizaciones de la invención reivindicada.

La figura 1 ilustra la alineación de la cadena pesada de LY75\_A1 (SEQ ID NO:1), la línea germinal humana VH 3-15 (SEQ ID NO:11) y la línea germinal humana JH4 (SEQ ID NO:12). Las regiones CDR de la cadena pesada de LY75\_A1 están subrayadas.

La figura 2 ilustra la alineación de la cadena ligera de LY75\_A1 (SEQ ID NO:2), la línea germinal humana VK O12 (SEQ ID NO:13) y la línea germinal humana JK4 (SEQ ID NO:14). Las regiones CDR de la cadena ligera de LY75\_A1 están subrayadas.

La figura 3a ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 en HT-29 y muestra que, aunque la mayoría de anticuerpos se unen a LY75, solo unos cuantos muestran eficacia.

La figura 3b ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en HT-29.

La figura 3c ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células RAJI.

La figura 3d ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células Namalwa.

La figura 3e ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células Karpas 299.

La figura 3f ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células BxPC3.

La figura 3g ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en HupT4.

La figura 3h ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células HPAFFII.

La figura 3i ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células EHEB.

La figura 3j ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células Mec-1.

La figura 3k ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células AML-193.

La figura 3l ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células HCC 70.

La figura 3m ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células HCC 1806.

La figura 3n ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células MDA-MB-468.

La figura 3o ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células RT4.

La figura 3p ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células 5637.

La figura 3q ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células SW780.

La figura 3r ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células SCC-9.

La figura 3s ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células OE 19.

La figura 3t ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células OVCAR-3.

La figura 3u ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células SK-OV-3.

La figura 3v ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células MOLP-8.

La figura 3w ilustra la actividad citotóxica de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en células RPMI8226.

La figura 4a ilustra la eficacia de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en el modelo de xenoinjerto en ratón SCID de linfoma de Burkitt Raji.

La figura 4b ilustra la eficacia de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en el modelo de xenoinjerto en ratón SCID de linfoma de Burkitt Namalwa.

La figura 4c ilustra la eficacia de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en el modelo de xenoinjerto en ratón desnudo atímico de adenocarcinoma pancreático HPAFII.

La figura 4d ilustra la eficacia de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en el modelo de xenoinjerto en ratón SCID de carcinoma de vejiga humano SW780.

La figura 4e ilustra la eficacia de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en el modelo de xenoinjerto en ratón desnudo atímico de MDA-MB-468.

La figura 4f ilustra la eficacia de los anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 o DM4 en el modelo de xenoinjerto en ratón desnudo atímico de adenocarcinoma colorrectal COLO205.

La figura 5a muestra la unión competitiva de un mAb anti-LY75 y un mAb anti-LY75 conjugados con MCC-DM1.

La figura 5b muestra la unión no competitiva de LY75\_A1 y un mAb anti-LY75 conjugado con MCC-DM1.

Las figuras 6a-6j muestran representaciones gráficas de la unión del anticuerpo LY75\_A1 a péptidos LY75 en una micromatriz de péptidos.

La figura 7 muestra una alineación de aminoácidos de péptidos a los que se une el anticuerpo LY75\_A1 tanto en el ensayo de micromatriz de péptidos como en el ensayo captura (en inglés "pull down") de péptidos. Los péptidos resaltados son aquellos que es probable que formen el epítipo reconocido por el anticuerpo LY75\_A1.

La figura 8 muestra el efecto antiproliferativo de diferentes dosis (nM) de LY75\_DM4 como monoterapia o en combinación con ibrutinib sobre líneas celulares HBL-1 (LCBGD-CBA). (IC=índice de combinación de Chou-Talalay). IC de la mediana=0,24.

#### Descripción detallada de la invención

La presente exposición se refiere a combinaciones farmacéuticas que comprenden los componentes (A) y (B) tal como se definen en la presente memoria, en donde la combinación farmacéutica se encuentra en la forma de una preparación combinada para la utilización simultánea, separada o secuencial, y en donde la combinación farmacéutica está destinada a la utilización en el tratamiento del LCBGD o linfoma no Hodgkin. El componente (A) se refiere a un anticuerpo anti-LY75 tal como se define en la presente memoria. El componente (B) se refiere a ibrutinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los componentes (A) y (B) según la invención se definen en la reivindicaciones.

Un ejemplo de la proteína LY75 se proporciona en SEQ ID NO:15 en la presente memoria. Las expresiones "anticuerpos anti-LY75" y "anticuerpos de LY75" se utilizan intercambiamente en la presente memoria.

Los anticuerpos de LY75 dados a conocer en la presente memoria pueden internalizarse al ponerlos en contacto con células que expresan el receptor de LY75. Tal como se comenta en la presente memoria, el receptor de LY75 está sobreexpresado y/o expresado diferencialmente en determinadas células de cáncer, incluyendo, aunque sin limitación, la leucemia, preferentemente la leucemia mieloide aguda o la leucemia linfocítica crónica, el linfoma, preferentemente el linfoma de células B LCBGD, el linfoma folicular, el linfoma de células del manto, el linfoma de tejido linfóide asociado a mucosas (LTLAM), el linfoma de células B rico en células T/histiocitos, el linfoma de Burkitt, el linfoma linfoplasmocítico, el linfoma linfocítico de células pequeñas, el linfoma de la zona marginal, el linfoma de células T, el linfoma de células T periféricas, el linfoma de células grandes anaplásicas y el linfoma de células T angioinmunoblástico.

De esta manera, cuando los anticuerpos de LY75 dados a conocer en la presente memoria se conjugan con fármacos (en ocasiones denominados en la presente memoria "conjugados de anticuerpo-fármaco" o "CAF"), la internalización de estas moléculas de CAF en las células de cáncer resulta en la muerte celular y, de esta manera, en el tratamiento del tumor.

Los anticuerpos anti-LY75 poseen características estructurales particulares, tales como regiones CDR, con secuencias de aminoácidos particulares. En la presente memoria se describe un grupo de CDR que pueden formar un reactivo de afinidad, p. ej., un anticuerpo, que muestra unión a LY75.

El antígeno linfocitario 75 actúa como un receptor endocítico para dirigir los antígenos capturados desde el espacio extracelular hasta un compartimiento especializado de procesamiento de antígenos, y se cree que causa una reducción en la proliferación de los linfocitos B.

Según SWISS-PROT, el antígeno linfocitario 75 se expresa en bazo, timo, colon y linfocitos de sangre periférica. Se ha detectado en líneas celulares mieloides y linfoides B. Las isoformas designadas en la presente memoria OGTA076b y OGTA076c se expresan en células de linfoma de Hodgkin malignas denominadas células de Hodgkin y de Reed-Sternberg (HRS). LY75 actúa como un receptor endocítico que dirige los antígenos capturados desde el espacio extracelular a un compartimiento especializado de procesamiento de antígenos. Causa una reducción de la proliferación de los linfocitos B.

Se ha observado la expresión de LY75 en los cánceres pancreático, vesicular, ovárico, mamario (incluyendo el triple negativo), colorrectal, esofágico, cutáneo, tiroideo y pulmonar (no microcítico), así como en el mieloma múltiple y en muchos subtipos diferentes de linfomas (incluyendo el LCBGD) y leucemias.

El anticuerpo anti-LY75 puede, en determinados casos, experimentar una reacción cruzada con LY75 de especies diferentes del ser humano. Por ejemplo, para facilitar la experimentación clínica, los anticuerpos anti-LY75 pueden experimentar reacción cruzada con moléculas de LY75 murinas o de primate. Alternativamente, en determinadas realizaciones, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para LY75 humano y podrían no mostrar reactividad cruzada con otras especies u otros tipos de reactividad cruzada no humana.

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria incluye una amplia variedad de estructuras, tal como apreciará el experto en la materia, que en algunas realizaciones contienen como mínimo un grupo de 6 CDR tal como se definen en la presente memoria, incluyendo, aunque sin limitación, anticuerpos tradicionales (incluyendo anticuerpos tanto monoclonales como policlonales), anticuerpos humanizados y/o quiméricos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos modificados, anticuerpos multispecíficos (incluyendo anticuerpos biespecíficos), y otros análogos conocidos de la técnica.

Las unidades estructurales de un anticuerpo tradicional normalmente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto habitualmente de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, en donde cada par presenta una cadena "ligera" (normalmente con un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (normalmente con un peso molecular de aproximadamente 50 a 70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. IgG presenta varias subclases, incluyendo, aunque sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. IgM presenta subclases, incluyendo, aunque sin limitación, IgM1 e IgM2. De esta manera, el término "isotipo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulina humana conocidos son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD e IgE. Debe entenderse que los anticuerpos terapéuticos también pueden comprender híbridos de cualquier combinación de isotipos y/o subclases.

En muchas realizaciones, se utilizan isotipos de IgG en la presente invención, en las que IgG1 encuentra uso particular en varias aplicaciones

La parte aminoterminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento de antígenos. En la región variable, se recogen tres bucles para cada uno de los dominios V de la cadena pesada y la cadena ligera, formando un sitio de unión a antígeno. Cada uno de los bucles se denomina "región determinante de complementariedad" (en lo sucesivo denominada "CDR", por sus siglas en inglés), en la que la variación de la secuencia de aminoácidos es más significativa. El término "variable" se refiere al hecho de que determinados segmentos de la región variable difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos. La variabilidad dentro de la región variable no está distribuida uniformemente. Por el contrario, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados "regiones de marco" (FR, por sus siglas en inglés) de 15 a 30 aminoácidos separados por regiones más cortas de extrema variabilidad denominadas "regiones hipervariables", cada una de las cuales presenta una longitud de 9 a 15 aminoácidos o mayor.

Cada VH y VL está compuesta de tres regiones hipervariables ("regiones determinantes de complementariedad", "CDR") y cuatro FR, dispuestas, de extremo aminoterminal a extremo carboxiterminal, en el orden siguiente: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4.

La región hipervariable generalmente comprende los residuos aminoácidos entre aproximadamente los residuos aminoácidos 24 y 34 (LCDR1; "L" denota cadena ligera), 50 a 56 (LCDR2) y 89 a 97 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y entre aproximadamente 31 y 35B (HCDR1; "H" denota cadena pesada), 50 a 65 (HCDR2) y 95 a 102 (HCDR3) en la región variable de cadena pesada; Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5a ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) y/o aquellos residuos que forman un bucle hipervariable (p. ej., los residuos 26 a 32 (LCDR1), 50 a 52 (LCDR2) y 91 a 96 (LCDR3) en la región variable de cadena ligera y 26 a 32 (HCDR1), 53 a 55 (HCDR2) y 96 a 101 (HCDR3) en la región variable de cadena pesada; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917. Se describen CDR específicas de la invención, posteriormente.

En toda la presente especificación generalmente se utiliza el sistema de numeración de Kabat al hacer referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1 a 107 de la región variable de cadena ligera y los residuos 1 a 113 de la región variable de cadena pesada) (p. ej., Kabat et al., *supra* (1991)).

Las CDR contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno, o más específicamente, el sitio de unión epítipo de los anticuerpos. El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que se une específicamente una inmunoglobulina o anticuerpo. Los epítopos pueden estar formados tanto de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de la proteína. Los epítopos formados de aminoácidos contiguos normalmente resultan retenidos al exponerlos a solventes desnaturizantes, mientras que los epítopos formados por plegamiento terciario normalmente se pierden bajo tratamiento con solventes desnaturizantes. Un epítipo generalmente incluye por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Tal como se describe en la presente memoria, los métodos para determinar qué epítopos se unen a un anticuerpo dado (es decir, el mapeado de los epítopos) son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen, por ejemplo, los ensayos de inmunotransferencia y de inmunoprecipitación, en los que se someten a ensayo péptidos solapantes o contiguos de LY75 para reactividad con el anticuerpo anti-LY75 dado. Entre los métodos de determinación de la conformación espacial de los epítopos se incluyen técnicas del estado de la técnica y aquellas descritas en la presente memoria, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional (ver, p. ej., Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

La expresión "mapeado de epítomos" se refiere al procedimiento de identificación de los determinantes moleculares para el reconocimiento anticuerpo-antígeno.

La parte carboxiterminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Kabat et al. han recopilado numerosas secuencias primarias de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. Basándose en el grado de conservación de las secuencias, han clasificado las secuencias primarias individuales en regiones CDR y regiones de marco, y han generado una lista de las mismas (ver la obra "Sequences of immunological interest", 5a edición, publicación del NIH, n.º 91-3242, E.A. Kabat et al.).

En la subclase IgG de inmunoglobulinas, hay varios dominios de inmunoglobulina en la cadena pesada. La expresión "dominio de inmunoglobulina (Ig)" se refiere a una región de una inmunoglobulina que presenta una clara estructura terciaria. Resultan de interés en la presente invención los dominios de cadena pesada, incluyendo los dominios pesados constantes (CH) y los dominios bisagra. En el contexto de los anticuerpos IgG, cada uno de los isotipos de IgG presenta tres regiones CH. De acuerdo con ello, los dominios "CH" en el contexto de las IgG son los siguientes: "CH1" se refiere a las posiciones 118 a 220 según el índice EU, tal como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones 237 a 340 según el índice EU, tal como en Kabat, y "CH3" se refiere a las posiciones 341 a 447 según el índice EU, tal como en Kabat.

Otro tipo de dominio de Ig de la cadena pesada es la región de bisagra. El término "bisagra" o "región bisagra" o "región bisagra de anticuerpo" o "región bisagra de inmunoglobulina" en la presente memoria se refiere al polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y segundo dominio constante de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG finaliza en la posición EU 220, y el dominio CH2 de IgG se inicia en el residuo EU 237. De esta manera, para IgG, la bisagra de anticuerpo se define en la presente memoria que incluye las posiciones 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), en el que la numeración es según el índice EU, tal como en Kabat. En algunas realizaciones, por ejemplo en el contexto de una región Fc, está incluida la bisagra inferior, en donde "bisagra inferior" se refiere generalmente a las posiciones 226 o 230.

Resultan de particular interés en la presente invención las regiones Fc. El término "Fc" o la expresión "región Fc" o "dominio Fc" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren al polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo excluyendo el primer dominio de la región constante de inmunoglobulina y, en algunos casos, parte de la bisagra. De esta manera, Fc se refiere a los dos últimos dominios de la región constante de inmunoglobulina de IgA, IgD e IgG, a los últimos tres dominios de la región constante de inmunoglobulina de IgE e IgM, y a la bisagra flexible en el lado N-terminal a dichos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, el dominio Fc comprende los dominios de inmunoglobulina C $\gamma$ 2 y C $\gamma$ 3 (C $\gamma$ 2 y C $\gamma$ 3), y la región de la bisagra inferior, entre C $\gamma$ 1 (C $\gamma$ 1) y C $\gamma$ 2 (C $\gamma$ 2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de cadena pesada de la IgG humana habitualmente se define como incluyendo los residuos C226 o P230 hasta su extremo carboxilotermino, en donde la numeración es según el índice EU, tal como en Kabat. En algunas realizaciones, tal como se describe en mayor detalle posteriormente, se realizan modificaciones de aminoácidos en la región Fc, por ejemplo para alterar la unión a uno o más receptores Fc $\gamma$ R o al receptor FcRn.

En algunas realizaciones, los anticuerpos son de longitud completa. La expresión "anticuerpo de longitud completa" en la presente memoria se refiere a la estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo las regiones variables y constantes, incluyendo una o más modificaciones tales como las descritas en la presente memoria.

Alternativamente, los anticuerpos pueden ser una variedad de estructuras, incluyendo, aunque sin limitación, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos biespecíficos, minicuerpos, anticuerpos de dominio, anticuerpos sintéticos (en ocasiones denominados en la presente memoria "miméticos de anticuerpo"), anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fusiones de anticuerpos (en ocasiones denominados "conjugados de anticuerpos") y fragmentos de cada uno de los mismos, respectivamente. Las estructuras que se basan en la utilización de un grupo de CDR están incluidas en la definición de "anticuerpo".

En una realización, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. Entre los fragmentos de anticuerpo específicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo, (iv) el fragmento dAb (Ward et al., 1989, Nature 341:544-546), que consiste en una única región variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos, (vii) moléculas de Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos mediante un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien formando un sitio de unión a antígeno (Bird et al., 1988, Science 242:423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883), (viii) Fv de cadena sencilla biespecífico (documento n.º WO 03/11161) y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos mediante fusión génica (Tomlinson et al., 2000, Methods Enzymol. 326:461-479; documento n.º WO94/13804; Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-6448).



En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser una mezcla de diferentes especies, p. ej., un anticuerpo quimérico y/o un anticuerpo humanizado. Es decir, en la presente invención, los grupos de CDR pueden utilizarse con regiones de marco y constantes diferentes de las descritas específicamente mediante secuencia en la presente memoria.

En general, tanto "anticuerpos quiméricos" como "anticuerpos humanizados" se refiere a anticuerpos que combinan regiones de más de una especie. Por ejemplo, "anticuerpos quiméricos" tradicionalmente comprende una o más regiones variables de un ratón (o rata, en algunos casos) y la región o regiones constantes de un ser humano. La expresión "anticuerpos humanizados" generalmente se refiere a anticuerpos no humanos en las que las regiones de marco de dominio variable se han intercambiado por secuencias que se encuentran en anticuerpos humanos. Generalmente, en un anticuerpo humanizado, todo el anticuerpo, excepto las CDR, está codificado por un polinucleótido de origen humano o es idéntico a tal anticuerpo excepto dentro de sus CDR. Las CDR, algunas o la totalidad de las cuales está codificada por ácidos nucleicos que se originan en un organismo no humano, se injertan en el marco de lámina beta de una región variable de anticuerpo humano para crear un anticuerpo, la especificidad del cual está determinada por las CDR injertadas. La creación de este tipo de anticuerpos se describe en, p. ej., el documento n.º WO 92/11018, Jones, 1986, *Nature* 321:522-525; Verhoeyen et al., 1988, *Science* 239:1534-1536. El término "retromutación" de residuos de marco aceptor seleccionados a los residuos donantes correspondientes con frecuencia resulta necesaria para recuperar afinidad que se ha perdido en el constructo injertado inicial (documentos n.º US 5530101, n.º US 5585089, n.º US 5693761, n.º US 5693762, n.º US 6180370, n.º US 5859205, n.º US 5821337, n.º US 6054297 y n.º US 6407213). El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, generalmente la de una inmunoglobulina humana, y de esta manera, generalmente comprenderá una región Fc humana. También pueden generarse anticuerpos humanizados utilizando ratones con un sistema inmunitario genéticamente modificado (Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-654). Es bien conocida de la técnica una variedad de técnicas y métodos para humanizar y dar nueva forma a anticuerpos no humanos (ver Turushita y Vasquez, 2004, *Humanization of Monoclonal Antibodies*, *Molecular Biology of B Cells*, 533-545, Elsevier Science (EE. UU.) y referencias citadas en ella). Entre los métodos de humanización se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los métodos descritos en Jones et al., 1986, *Nature* 321:522-525; Riechmann et al., 1988, *Nature* 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, *Science*, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-33; He et al., 1998, *J. Immunol.* 160:1029-1035; Carter et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-9; Presta et al., 1997, *Cancer Res.* 57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, *Protein Eng.* 11:321-8. La humanización u otros métodos para reducir la inmunogenicidad de las regiones variables de anticuerpo no humanas pueden incluir métodos de resuperficialización, tal como se describen en, por ejemplo, Roguska et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:969-973. En una realización, el anticuerpo parental ha sido sometido a maduración de la afinidad, tal como es conocida de la técnica. Pueden utilizarse métodos basados en la estructura para la humanización y la maduración de la afinidad, por ejemplo tal como se describen en el documento n.º US 2006/0008883. Pueden utilizarse métodos basados en selección para humanizar y/o madurar la afinidad de regiones variables de anticuerpo, incluyendo, aunque sin limitación, los métodos descritos en Wu et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 294:151-162; Baca et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272(16):10678-10684; Rosok et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271(37):22611-22618; Rader et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8910-8915; Krauss et al., 2003, *Protein Engineering* 16(10):753-759. Otros métodos de humanización pueden implicar la injertación de solo partes de las CDR, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, los métodos descritos en el documento n.º US 2001/0035606; Tan et al., 2002, *J. Immunol.* 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, *J. Immunol.* 169:3076-3084.

Los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria pueden ser aislados o recombinantes. El término "aislado", utilizado para describir los diversos polipéptidos dados a conocer en la presente memoria, se refiere a un polipéptido que ha sido identificado y separado y/o recuperado a partir de una célula o cultivo celular a partir del cual se ha expresado. De esta manera, "anticuerpo aislado" pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que presentan especificidades antigénicas diferentes (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a LY75 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de LY75). De esta manera, un anticuerpo "aislado" es uno que se encuentra en una forma no observada naturalmente en la naturaleza (p. ej., que no ocurre naturalmente). Un anticuerpo aislado tal como se define en la presente memoria puede incluir, en una realización, por lo menos un aminoácido que no se observa en el anticuerpo que ocurre "naturalmente". Este aminoácido puede introducirse mediante una adición o una sustitución. Se entenderá que el aminoácido introducido puede ser un aminoácido que ocurre naturalmente o un aminoácido que no ocurre naturalmente. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención son proteínas recombinantes, proteínas aisladas o proteínas sustancialmente puras. Una proteína "aislada" no está acompañada por como mínimo parte del material con el que está asociada normalmente en su estado natural, por ejemplo constituyendo por lo menos aproximadamente 5 %, o por lo menos aproximadamente 50 % en peso de la proteína total en una muestra dada. Se entiende que la proteína aislada puede constituir entre 5 % y 99,9 % en peso del contenido total de proteína, dependiendo de las circunstancias. Por ejemplo, la proteína puede prepararse a una concentración significativamente más alta mediante la utilización de un promotor inducible o promotor de alta expresión, de manera que la proteína se produce a niveles de concentración incrementada. En el caso de las proteínas recombinantes, la definición incluye la producción de un anticuerpo en una amplia variedad de organismos y/o células huésped que son conocidos de la técnica en los que no se produce naturalmente. Habitualmente se preparará un polipéptido aislado mediante por lo menos una etapa de purificación. Un "anticuerpo aislado" se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que presentan diferentes especificidades antigénicas. Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une

específicamente a LY75 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de LY75, con la excepción de anticuerpos que se unen a CD20.

Los anticuerpos monoclonales aislados, que presentan especificidades diferentes, pueden combinarse en una composición bien definida. De esta manera, por ejemplo, el anticuerpo de la invención puede incluirse o excluirse opcional e individualmente en una formulación, tal como se comenta en mayor detalle posteriormente.

Los anticuerpos anti-LY75 de la presente invención se unen específicamente a LY75 (p. ej., SEQ ID NO:15). La expresión "unión específica" o "se une específicamente a" o "es específico para" un antígeno particular o un epítipo se refiere a una unión que es mediblemente diferente de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, mediante la determinación de la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no presenta actividad de unión. Por ejemplo, puede determinarse la unión específica mediante competición con una molécula de control que es similar a la diana.

Una unión específica para un antígeno particular o un epítipo puede ser mostrada por, por ejemplo, un anticuerpo que presente una  $K_D$  para un antígeno o epítipo de por lo menos aproximadamente  $10^{-4}$  M, por lo menos aproximadamente  $10^{-5}$  M, por lo menos aproximadamente  $10^{-6}$  M, por lo menos aproximadamente  $10^{-7}$  M, por lo menos aproximadamente  $10^{-8}$  M, por lo menos aproximadamente  $10^{-9}$  M, alternativamente por lo menos aproximadamente  $10^{-10}$  M, por lo menos aproximadamente  $10^{-11}$  M, por lo menos aproximadamente  $10^{-12}$  M, o superior, en donde  $K_D$  se refiere a una tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Normalmente, un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno presentará una  $K_D$  que es 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 o más veces mayor para una molécula de control que para el antígeno o epítipo. Sin embargo, en la presente invención, al administrar CAF de los anticuerpos de LY75 de la invención, lo que es importante es que la  $K_D$  resulte suficiente para permitir la internalización y, de esta manera, la muerte celular, sin efectos secundarios significativos.

Además, una unión específica para un antígeno particular o un epítipo puede ser mostrada, por ejemplo, por un anticuerpo que presente una  $K_A$  o  $K_a$  para un antígeno o epítipo por lo menos 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000, 10.000 o más veces mayor para el epítipo que para un control, en donde  $K_A$  o  $K_a$  se refiere a la tasa de asociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

Pueden llevarse a cabo ensayos estándares para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos a LY75 o CD20 al nivel de proteínas o células y son conocidos de la técnica, incluyendo, por ejemplo, los ensayos ELISA, transferencias western, RIA, ensayos BIAcore® y análisis de citometría de flujo. Los ensayos adecuados se describen en detalle en los Ejemplos. La cinética de unión (p. ej., la afinidad de unión) de los anticuerpos también pueden evaluarse mediante ensayos conocidos de la técnica, tales como mediante análisis con el sistema BIAcore®. Para evaluar la unión a células tumorales de células B Raji o Daudi, pueden obtenerse células Raji (ATCC, n.º de depósito CCL86) o Daudi (ATCC, n.º de depósito CCL-213) a partir de fuentes públicamente disponibles, tales como la American Type Culture Collection, y utilizarse en ensayos estándares, tales como el análisis de citometría de flujo.

Los anticuerpos de LY75 que se unen a LY75 (SEQ ID NO:15) pueden internalizarse al ponerse en contacto con células que expresan LY75 sobre la superficie celular. Estos anticuerpos se denominan en la presente memoria anticuerpos "anti-LY75" o, para mayor facilidad de descripción, "anticuerpos de LY75". Ambas expresiones se utilizan indistintamente en la presente memoria.

Los anticuerpos de LY75 son internalizados al entrar en contacto con células, especialmente células tumorales, que expresan LY75 sobre la superficie. Es decir, los anticuerpos de LY75 tal como se definen en la presente memoria que también comprenden conjugados de fármacos, son internalizados por células tumorales, resultando en la liberación del fármaco y la consiguiente muerte celular, permitiendo el tratamiento de cánceres que muestran expresión de LY75. La internalización en este contexto puede medirse de varias maneras. En una realización, los anticuerpos de LY75 se ponen en contacto con células, tales como una línea celular descrita de manera general en la presente memoria, utilizando ensayos estándares, tales como MAbZap. Resultará evidente al experto en la materia que el ensayo MAbZap es representativo del efecto que se esperaría observar con un conjugado de anticuerpo-fármaco (CAF). En este último caso, el CAF resultaría internalizado, introduciendo de esta manera el fármaco en la célula. Un fármaco tóxico presentaría la capacidad de matar la célula, es decir, de matar la célula cancerosa diana. Los datos de ensayos MAbZap son fácilmente aceptados por los expertos en la materia como representativos de ensayos de CAF (Kohls, M. y Lappi D. [2000] Biotechniques, vol. 28, n.º 1, 162-165).

En dichas realizaciones de ensayo *in vitro*, se añaden los anticuerpos de LY75, junto con un anticuerpo anti-LY75 que comprende una toxina; por ejemplo, el anticuerpo de LY75 puede ser murino o humanizado y el anticuerpo anti-LY75 puede ser antimurino o antihumanizado y contener una toxina, tal como saporina. Al formarse el complejo de [anticuerpo de LY75]conjugado de fármaco anticuerpo anti-LY75], el complejo es internalizado y el fármaco (p. ej., saporina) es liberado, resultando en la muerte de la célula. Solo tras la internalización se libera el fármaco, y de esta manera las células se mantienen viables en ausencia de internalización. Tal como se describe de manera general posteriormente, sin respaldo teórico, en aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti-LY75 contiene la toxina, y con la internalización, se corta la unión entre el anticuerpo y la toxina, liberando la toxina y matando la célula.

En una realización, el anticuerpo anti-LY75 comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera o las regiones variables (VR, por sus siglas en inglés) del anticuerpo particular descrito en la presente memoria como "LY75\_A1". De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en una realización, el anticuerpo comprende los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) del anticuerpo LY75\_A1 que presenta la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1, y los dominios CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena ligera (VL) del anticuerpo LY75\_A1 que presenta la secuencia mostrada en la SEQ ID NO:2.

En otra realización, el anticuerpo anti-LY75 comprende una región variable de cadena pesada que comprende una primera vhCDR que comprende la SEQ ID NO:5, una segunda vhCDR que comprende la SEQ ID NO:6, y una tercera vhCDR que comprende la SEQ ID NO:7, y una región variable de cadena ligera que comprende una primera vlCDR que comprende la SEQ ID NO:8, una segunda vlCDR que comprende la SEQ ID NO:9 y una tercera vlCDR que comprende la SEQ ID NO:10.

En una realización adicional, los anticuerpos anti-LY75 se unen a LY75 humano e incluyen una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NO:1 y/o 2, respectivamente. La expresión "modificaciones de secuencia conservadoras" pretende incluir modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Entre tales modificaciones conservadoras se incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Pueden introducirse modificaciones en un anticuerpo de la invención mediante técnicas estándares conocidas, tales como la mutagénesis dirigida a sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos son unas en las que el residuo aminoácido es sustituido por un residuo aminoácido que presenta una cadena lateral similar. Las familias de residuos aminoácidos que presentan cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Entre estas familias se incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina e histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico y ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína y triptófano), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina y metionina), cadenas laterales de ramificación beta (p. ej., treonina, valina e isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano e histidina). De esta manera, uno o más residuos aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la invención pueden sustituirse por otros residuos aminoácidos de la misma familia de cadenas laterales y el anticuerpo alterado puede someterse a ensayo para la retención de función utilizando los ensayos funcionales descritos en la presente memoria. Sin embargo, la invención no comprende ninguna combinación farmacéutica basada en dichas regiones CDR modificadas. Estas secuencias de las CDR según la invención se definen en la reivindicación 1.

Los anticuerpos aislados tal como se definen en la reivindicación 1 y que incluyen regiones variables de cadena pesada y ligera que presentan una identidad de secuencia de por lo menos 80 %, por lo menos 85 %, por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 %, o superior respecto a cualquiera de las secuencias anteriormente indicadas también se encuentran incluidos en la presente invención. Los intervalos intermedios a los valores anteriormente indicados, p. ej., regiones variables de cadena pesada y ligera que presentan una identidad de secuencia de por lo menos 80 % a 85 %, 85 % a 90 %, 90 % a 95 % o 95 % a 100 % respecto a cualquiera de las secuencias anteriormente indicadas también se pretenden que se encuentren comprendidas en la presente invención. En una realización, el anticuerpo anti-LY75 es tal como se define en la reivindicación 1 y comprende una región variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID NO:1 o una secuencia que es por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO:1. En otra realización, el anticuerpo anti-LY75 es tal como se define en la reivindicación 1 y comprende una región variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID NO:2 o una secuencia que es por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % idéntica a la SEQ ID NO:2. En otra realización, el anticuerpo anti-LY75 es tal como se define en la reivindicación 1 y comprende una región de marco de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % idéntica al marco de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 1 que comprende las SEQ ID NO:16, 17 y 18. En otra realización, el anticuerpo anti-LY75 es tal como se define en la reivindicación 1 y comprende una región de marco de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos 90 %, por lo menos 91 %, por lo menos 92 %, por lo menos 93 %, por lo menos 94 %, por lo menos 95 %, por lo menos 96 %, por lo menos 97 %, por lo menos 98 %, por lo menos 99 % idéntica al marco de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 2 que comprende las SEQ ID NO:19, 20 y 21.

En una realización, el anticuerpo anti-LY75 se denomina en la presente memoria "anticuerpo LY75\_A1" que comprende las CDR siguientes:

|                      |           |
|----------------------|-----------|
| A1                   | SEQ ID NO |
| CDR1 variable pesada | 5         |

|                      |    |
|----------------------|----|
| CDR2 variable pesada | 6  |
| CDR3 variable pesada | 7  |
| CDR1 variable ligera | 8  |
| CDR2 variable ligera | 9  |
| CDR3 variable ligera | 10 |

En la presente memoria se dan a conocer también cadenas pesadas y ligeras variables que comprenden los grupos de CDR de la invención, así como cadenas pesadas y ligeras de longitud completa (p. ej., que también comprenden regiones constantes). Tal como apreciará el experto en la materia, los grupos de CDR del anticuerpo anti-LY75 pueden incorporarse en regiones constantes murinas, humanizadas o humanas (incluyendo regiones de marco).

Los anticuerpos monoclonales pueden caracterizarse por la unión a LY75 utilizando una variedad de técnicas conocidas. Generalmente, los anticuerpos se caracterizan inicialmente mediante ELISA. Brevemente, pueden recubrirse placas de microtitulación con LY75 purificado en PBS y después bloquearse con proteínas irrelevantes, tales como albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) diluida en PBS. Se añaden las diluciones de plasma procedente de ratones inmunizados con LY75 a cada pocillo y se incuban durante 1 a 2 horas a 37 °C. Las placas se lavan con PBS/Tween-20 y después se incuban con un reactivo policlonal de cabra específico anti-Fc de IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37 °C. Tras el lavado, las placas se revelan con sustrato ABTS y se analizan con una DO de 405. Preferentemente, para las fusiones se utilizan los ratones que produzcan los títulos más altos.

Puede utilizarse un ensayo ELISA tal como se ha descrito anteriormente para cribar para anticuerpos y, de esta manera, hibridomas que producen anticuerpos que muestran reactividad positiva con el inmunógeno LY75. Los hibridomas que se unen, preferentemente con alta afinidad, a LY75 seguidamente pueden subclonarse y caracterizarse adicionalmente. A continuación, puede seleccionarse un clon de cada hibridoma, que retenga la reactividad de las células parentales (mediante ELISA) para generar un banco celular, y para la purificación de anticuerpos.

Para purificar los anticuerpos anti-LY75, los hibridomas seleccionados pueden cultivarse en frascos rotatorios, frascos de agitación de dos litros o en otros sistemas de cultivo. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad para proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) a fin de purificar la proteína. Tras el intercambio del tampón por PBS, puede determinarse la concentración a partir de la DO<sub>280</sub> aplicando un coeficiente de extinción de 1,43 o preferentemente mediante análisis nefelométrico. La IgG puede comprobarse mediante electroforesis en gel y mediante un método específico de antígeno.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-LY75 seleccionados se unen a epítopos únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse utilizando reactivos disponibles comercialmente (Pierce, Rockford, IL). La unión de MAb biotinilados puede detectarse con una sonda marcada con estreptavidina. Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden llevarse a cabo un ensayo ELISA de isotipo utilizando técnicas reconocidas del estado de la técnica. Por ejemplo, pueden recubrirse pocillos de placas de microtitulación con 10 µg/ml de anti-Ig durante la noche a 4 °C. Tras el bloqueo con BSA al 5 %, las placas se hacen reaccionar con 10 µg/ml de anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante dos horas. A continuación, los pocillos pueden hacerse reaccionar con IgG1 u otras sondas conjugadas específicas de isotipo. Las placas se revelan y analizan tal como se ha descrito anteriormente.

Para someter a ensayo la unión de los anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan LY75, puede utilizarse la citometría de flujo. Brevemente, se mezclan líneas celulares y/o PBMC humanas que expresan LY75 unido a membrana (cultivado bajo condiciones de cultivo estándares) con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene BSA al 0,1 % a 4 °C durante 1 hora. Tras el lavado, las células se hacen reaccionar con anticuerpo anti-IgG marcado con fluoresceína bajo las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras pueden analizarse con un instrumento FACSCAN utilizando luz y propiedades de dispersión lateral para clasificar células individuales y se determina la unión de los anticuerpos marcados. Puede utilizarse un ensayo alternativo que utilice microscopía de fluorescencia (además de o en sustitución de) el ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente tal como se ha descrito anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, aunque puede presentar una sensibilidad reducida dependiendo de la densidad del antígeno.

Las IgG anti-LY75 pueden someterse a ensayo adicional para reactividad con el antígeno LY75 mediante transferencia western. Brevemente, pueden prepararse extractos celulares de células que expresan LY75 y someterse a electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida. Tras la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ratón al 20 % y se sondean con los anticuerpos monoclonales que van a someterse a ensayo. La unión de IgG puede detectarse utilizando anti-IgG-fosfatasa alcalina y revelarse con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Entre los métodos para analizar la afinidad de unión, la reactividad cruzada y la cinética de unión de diversos anticuerpos anti-LY75 se incluyen ensayos estándares conocidos de la técnica, por ejemplo, análisis de resonancia del plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) Biacore™ utilizando un instrumento Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Suecia).

En una realización, el anticuerpo se une específicamente a LY75 humano que comprende la SEQ ID NO: 15. Preferentemente, el anticuerpo anti-LY75 se une a LY75 humano con afinidad elevada.

Preferentemente, el anticuerpo anti-LY75 se une a una proteína LY75 con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-8}$  M o inferior, se une a una proteína LY75 con una  $K_D$  de  $2 \times 10^{-8}$  M o inferior, se une a una proteína LY75 con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-9}$  M o inferior, se une a una proteína LY75 con una  $K_D$  de  $4 \times 10^{-9}$  M o inferior, se une a una proteína LY75 con una  $K_D$  de  $3 \times 10^{-9}$  M o inferior, se une a una proteína LY75 con una  $K_D$  de  $2 \times 10^{-9}$  M o inferior, se une a una proteína LY75 con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-9}$  M o inferior, se une a una proteína LY75 con una  $K_D$  de  $5 \times 10^{-10}$  M o inferior, o se une a una proteína LY75 con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-10}$  M o inferior.

Una vez se ha aislado un único mAb anti-LY75 arquetípico que presente las propiedades deseadas descritas en la presente memoria, pueden generarse otros mAb con propiedades similares, p. ej., que presenten el mismo epítipo. Por ejemplo, pueden inmunizarse ratones con LY75 tal como se describe en la presente memoria, producirse hibridomas y los mAb resultantes cribarse para la capacidad e competir con el mAb arquetípico para la unión a LY75. Los ratones también pueden inmunizarse con un fragmento más pequeño de LY75 que contenga el epítipo al que se une el mAb arquetípico. El epítipo puede localizarse mediante, p. ej., cribado para la unión a una serie de péptidos solapantes que comprenden LY75. Alternativamente, puede utilizarse el método de Jespersen et al., *Biotechnology* 12:899, 1994, para guiar la selección de los mAb que presentan el mismo epítipo, y por lo tanto, propiedades similares al mAb arquetípico. Utilizando la exposición fágica, en primer lugar se empareja la cadena pesada del anticuerpo arquetípico con un repertorio de cadenas ligeras (preferentemente humanas) para seleccionar un mAb de unión a LY75, y después se empareja la nueva cadena ligera con un repertorio de cadenas pesadas (preferentemente humanas) para seleccionar un mAb de unión a LY75 (preferentemente humano) que presente el mismo epítipo que el mAb arquetípico. Alternativamente, pueden obtenerse variantes del mAb arquetípico mediante mutagénesis de ADNc codificante de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo.

La expresión "polipéptido parental", "proteína parental", "polipéptido precursor" o "proteína precursora" tal como se utiliza en la presente memoria se refieren a un polipéptido no modificado que posteriormente es modificado para generar una variante. En general, los polipéptidos parentales en la presente memoria son LY75\_A1. De acuerdo con lo anterior, la expresión "anticuerpo parental" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo que es modificado para generar un anticuerpo variante.

La expresión "tipo salvaje" o "WT" (por sus siglas en inglés) o "nativo" en la presente memoria se refieren a una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluyendo variaciones alélicas. Una proteína, polipéptido, anticuerpo, inmunoglobulina, IgG, etc. WT presenta una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no ha sido deliberadamente modificada.

La expresión "región Fc variante" en la presente memoria se refiere a una secuencia de Fc que difiere de la de una secuencia de Fc de tipo salvaje en virtud de la modificación de por lo menos un aminoácido. La variante de Fc puede referirse al polipéptido Fc mismo, a composiciones que comprenden el polipéptido variante Fc, o a la secuencia de aminoácidos.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-LY75 dados a conocer en la presente memoria están compuestos de un dominio Fc variante. Tal como es conocido de la técnica, la región Fc de un anticuerpo interactúa con varios receptores y ligandos de Fc, proporcionando una serie de importantes capacidades funcionales denominadas "funciones efectoras". Entre estos receptores de Fc se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, (en el ser humano) FcγRI (CD64), incluyendo las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas FcγRIIa (incluyendo los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluyendo FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2) y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluyendo las isoformas FcγRIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158, correlacionados con la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés)) y FcγRIIIb (incluyendo los alotipos FcγRIIIb-NA1 y FcγRIIIb-NA2), FcRn (el receptor neonatal), C1q (proteína del complemento implicada en la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés)) y FcRn (el receptor neonatal implicado en la semivida en suero). Pueden realizarse modificaciones adecuadas en una o más posiciones, tal como se describe de manera general en, por ejemplo, el documento n.º US 2008/0154025 y referencias citadas en el mismo, y los documentos n.º US 2004/013210, n.º US 2005/0054832, n.º US 2006/0024298, n.º US 2006/0121032, n.º US 2006/0235208, n.º US 2007/0148170, n.º US 2009/0163699, y patentes US n.º 6.737.056, n.º 7.670.600 y n.º 6.086.875, y en particular, para sustituciones de aminoácidos específicas que incrementan la unión a receptores de Fc.

Además de las modificaciones indicadas anteriormente, pueden realizarse otras modificaciones. Por ejemplo, las moléculas pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro que unan los dominios VH y VL (Reiter et al., 1996, *Nature Biotech.* 14:1239-1245).

Además, las modificaciones de las cisteínas resultan particularmente útiles en aplicaciones de conjugados de anticuerpo-fármaco (CAF), descritas en mayor detalle posteriormente. En algunas realizaciones, la región constante de los anticuerpos puede modificarse para que contenga una o más cisteínas que son particularmente "reactivas con tiol", de manera que permita una colocación más específica y controlada de la fracción farmacéutica. Ver, por ejemplo, la patente US n.º 7.521.541.

Además, existe una variedad de modificaciones covalentes de los aminoácidos que pueden llevarse a cabo tal como se describe posteriormente.

Las modificaciones covalentes de los anticuerpos están incluidas dentro del alcance de la presente invención, y generalmente, aunque no siempre, se llevan a cabo después de la traducción. Por ejemplo, se introducen varios tipos de modificaciones covalentes del anticuerpo en la molécula haciendo reaccionar residuos aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos N- o C-terminales.

Los residuos cisteinilo más habitualmente se hacen reaccionar con  $\alpha$ -haloacetatos (y aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, proporcionando derivados carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos cisteinilo también pueden derivatizarse mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido  $\alpha$ -bromo- $\beta$ -(5-imidazoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, 2-piridil-sulfuro de metilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol y similares.

Los residuos histidilo se derivatizan mediante reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5 a 7,0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral histidilo. El bromuro de par-bromofenacilo también resulta útil; la reacción se lleva a cabo preferentemente en cacodilato sódico 0,1 M, a pH 6,0.

Los residuos lisinilo y aminotermiales se hacen reaccionar con anhídridos de ácido succínico o de otros ácidos carboxílicos. La derivatización de dichos agentes presenta el efecto de revertir la carga de los residuos lisinilo. Entre otros reactivos adecuados para derivatizar los residuos que contienen alfa-amino se incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona y la reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

Los residuos arginilo se modifican mediante la reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se lleve a cabo bajo condiciones alcalinas debido al elevado pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como el grupo amino épsilon de la arginina.

Puede llevarse a cabo la modificación específica de los residuos tirosilo, con interés especial en la introducción de marcajes espectrales en los residuos tirosilo mediante la reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Más habitualmente, se utiliza N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil-tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los residuos tirosilo se yodan utilizando  $^{125}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$  para preparar proteínas marcadas para la utilización en radioinmunoensayo, en donde el método de la cloramina T descrito anteriormente resulta adecuado.

Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante la reacción con carbodiimidas ( $\text{R}'\text{-N}=\text{C}=\text{N-R}'$ ), donde R y R' son grupos alquilo opcionalmente diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos aspartilo y glutamilo se convierten en residuos asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones de amonio.

La derivatización con agentes bifuncionales resulta útil para entrecruzar anticuerpos con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para la utilización en una variedad de métodos, además de los métodos descritos posteriormente. Entre los agentes entrecruzantes utilizados habitualmente se incluyen, p. ej., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato) y maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Algunos agentes derivatizantes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato rinden compuestos intermedios fotoactivables que son capaces de formar enlaces cruzados en la presencia de luz. Alternativamente, se utilizan matrices insolubles en agua reactivas, tales como carbohidratos activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes US n.º 3.969.287, n.º 3.691.016, n.º 4.195.128, n.º 4.247.642, n.º 4.229.537 y n.º 4.330.440, para la inmovilización de proteínas.

Los residuos glutaminilo y asparaginilo se desamidán frecuentemente en los residuos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente. Alternativamente, estos residuos se desamidán bajo condiciones suavemente ácidas. Cualquier forma de estos residuos se encuentra comprendida dentro del alcance de la presente invención.

Entre otras modificaciones se incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de cadenas laterales de lisina, arginina y histidina (T.E. Creighton,

Proteins. Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79 a 86 [1983]), la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Además, tal como apreciará el experto en la materia, pueden añadirse marcajes (incluyendo marcajes fluorescentes, enzimáticos, magnéticos, radioactivos, etc.) a los anticuerpos (así como las demás composiciones de la invención).

Otro tipo de modificación covalente son las alteraciones en la glucosilación. En algunas realizaciones, los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria pueden estar total o parcialmente aglucosilados, p. ej., afucosilados.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende unir el anticuerpo a diversos polímeros no proteicos, incluyendo, aunque sin limitación, diversos polioles, tales como polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en, por ejemplo, el catálogo PEG 2005-2006 de Nektar Therapeutics (disponible en el sitio web de Nektar), patentes US n.º 4.640.835, n.º 4.496.689, n.º 4.301.144, n.º 4.670.417, n.º 4.791.192 o n.º 4.179.337. Además, tal como es conocido de la técnica, pueden realizarse sustituciones de aminoácidos en diversas posiciones dentro del anticuerpo a fin de facilitar la adición de polímeros, tales como PEG. Ver, por ejemplo, la publicación de patente US n.º 2005/0114037A1.

En realizaciones adicionales, los anticuerpos pueden comprender un marcaje. El término "marcado" en la presente memoria se refiere a que un compuesto presenta por lo menos un elemento, isótopo o compuesto químico unido para permitir la detección del compuesto. En general, los marcajes se clasifican en tres clases: a) marcajes isotópicos, que pueden ser radioactivos o isótopos pesados, b) magnéticos, eléctricos y térmicos, y c) tintes coloreados o luminiscentes, aunque entre los marcajes también se incluyen enzimas y partículas, tales como partículas magnéticas. Entre los marcajes preferentes se incluyen, aunque sin limitación, complejos de lantánido fluorescentes (incluyendo los de europio y terbio), y marcajes fluorescentes, incluyendo, aunque sin limitación, puntos cuánticos, fluoresceína, rodamina, tetrametilrodamina, eosina, eritrosina, cumarina, metilcumarinas, pireno, verde malaquita, estilbeno, amarillo Lucifer, azul Cascade, rojo Texas y pigmentos Alexa, los pigmentos Cy y otros descritos en la sexta edición de la Molecular Probes Handbook de Richard P. Haugland.

#### *Conjugados de anticuerpo-fármaco*

Los anticuerpos anti-LY75 dados a conocer en la presente memoria se conjugan con fármacos maitansinoides para formar conjugados de anticuerpo-fármaco (CAF). En general, los CAF se utilizan en aplicaciones oncológicas, donde la utilización de conjugados de anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos permite la administración dirigida de la fracción farmacéutica en tumores, lo que puede proporcionar una mayor eficacia, menor toxicidad, etc. Se proporciona una vista general de esta tecnología en Ducry et al., Bioconjugate Chem., 21:5-13 (2010); Carter et al., Cancer J. 14(3):154 (2008) y Senter, Current Opin. Chem. Biol. 13:235-244 (2009).

De esta manera, la invención proporciona combinaciones farmacéuticas tal como se definen en la reivindicación 1, que comprenden, entre otros, anticuerpos anti-LY75 conjugados con fármacos maitansinoides. Generalmente, la conjugación se lleva a cabo mediante unión covalente al anticuerpo, tal como se describe en mayor detalle posteriormente, y generalmente se basa en un conector, con frecuencia un enlace peptídico (que, tal como se describe posteriormente, puede diseñarse para que sea susceptible de corte por proteasas en el sitio diana o no). Además, tal como se ha indicado anteriormente, la unión de la unidad conector-fármaco (LU-D) puede llevarse a cabo mediante unión a cisteínas dentro del anticuerpo. Tal como apreciará el experto en la materia, puede cambiar el número de fracciones farmacéuticas por anticuerpo, dependiendo de las condiciones de la reacción, y la proporción fármaco:anticuerpo puede variar entre 1:1 y 10:1. Tal como apreciará el experto en la materia, el número real es una media.

Preferentemente, el anticuerpo anti-LY75 se conjuga con DM1 o DM4, lo más preferentemente a DM4. Los compuestos de maitansina adecuados para la utilización como fracciones farmacéuticas maitansinoides son bien conocidos de la técnica y pueden aislarse a partir de fuentes naturales de acuerdo con métodos conocidos, producirse utilizando técnicas de ingeniería genética (ver Yu et al. (2002) PNAS 99:7968-7973) o prepararse maitansinol y análogos de maitansinol sintéticamente de acuerdo con métodos conocidos. Tal como se describe posteriormente, los fármacos pueden modificarse mediante la incorporación de un grupo funcionalmente activo, tal como un grupo tiol o amina para la conjugación con el anticuerpo.

Entre las fracciones de fármaco maitansinoide de ejemplo se incluyen aquellas que presentan un anillo aromático modificado, tal como: C-19-decloro (patente US n.º 4.256.746) (preparado mediante reducción con hidruro de litio y aluminio de la ansamitocina P2); C-20-hidroxi (o C-20-desmetilo) +/-C-19-decloro (patente US n.º 4.361.650 y n.º 4.307.016) (preparado mediante desmetilación utilizando *Streptomyces* o *Actinomyces* o decloración utilizando LAH), y C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi (-OCOR), +/- decloro (patente US n.º 4.294.757) (preparado mediante acilación utilizando cloruros de acilo) y aquellos que presentan modificaciones en otras posiciones.

Entre las fracciones de fármaco maitansinoide se incluyen, además, aquellas que presentan modificaciones, tales como: C-9-SH (patente US n.º 4.424.219) (preparado mediante la reacción de maitansinol con H<sub>2</sub>S o P<sub>2</sub>S<sub>5</sub>); C-14-alcoximetil(desmetoxi/CH<sub>2</sub>OR) (patente US n.º 4.331.598); C-14-hidroximetilo o aciloximetilo (CH<sub>2</sub>OH o CH<sub>2</sub>OAc)

(patente US n.º 4.450.254) (preparado a partir de *Nocardia*); C-15-hidroxi/aciloxi (patente US n.º 4.364.866) (preparado mediante la conversión de maitansinol por *Streptomyces*); C-15-metoxi (patente US n.º 4.313.946 y n.º 4.315.929) (aislado a partir de *Trewia nudiflora*); C-18-N-desmetilo (patentes US n.º 4.362.663 y n.º 4.322.348) (preparado mediante la desmetilación del maitansinol por *Streptomyces*) y 4,5-desoxi (patente US n.º 4.371.533) (preparado mediante la reducción con tricloruro de titanio/LAH del maitansinol).

Resulta de utilidad particular DM1 (dado a conocer en la patente US n.º 5.208.020) y DM4 (dado a conocer en la patente US n.º 7.276.497). Ver también varios derivados de maitansinoide y métodos adicionales en los documentos n.º 5.416.064, n.º WO01/24763, n.º 7.303.749, n.º WO02/098883, n.º 6.441.163, n.º 7.368.565, n.º WO02/16368 y n.º WO04/1033272.

Los CAF que contienen maitansinoides, los métodos de preparación de los mismos y su utilización terapéutica se dan a conocer en, por ejemplo, las patentes US n.º 5.208.020, n.º 5.416.064, N.º 6.441.163 y patente europea n.º EP 0 425 235 B1. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describen CAF que comprenden un maitansinoide designado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se encontró que el conjugado era altamente citotóxico de las células de cáncer de colon en cultivo, y mostraba actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*.

Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992) describen CAF en los que se conjugó un maitansinoide mediante un conector disulfuro con el anticuerpo murino A7 de unión a un antígeno sobre líneas celulares de cáncer de colon humano o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se sometió a ensayo *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa  $3 \times 10^5$  antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco consiguió un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que podría incrementarse mediante el aumento del número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide mostró una baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Para las composiciones que comprenden una pluralidad de anticuerpos, la carga de fármaco se representa mediante "p", el número medio de moléculas de fármaco por anticuerpo. La carga de fármaco puede estar comprendida entre 1 y 20 fármacos (F) por anticuerpo. El número medio de fármacos por anticuerpo en la preparación de reacciones de conjugación puede caracterizarse mediante medios convencionales, tales como la espectroscopía de masas, ensayo ELISA y HPLC. También puede determinarse la distribución cuantitativa de los conjugados de anticuerpo-fármaco en términos de "p".

En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de conjugados de anticuerpo-fármaco homogéneos en los que "p" es un valor determinado de conjugados de anticuerpo-fármaco con otras cargas de fármaco puede conseguirse por medios tales como la HPLC de fase inversa o la electroforesis. En realizaciones de ejemplo, "p" es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, o una fracción de los mismos.

La generación de compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco puede conseguirse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia. Brevemente, los compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco pueden incluir un anticuerpo anti-LY75 como la unidad de anticuerpo, un fármaco y opcionalmente un conector que une el fármaco y el agente de unión.

Se encuentran disponibles varias reacciones diferentes para la unión covalente de fármacos y/o conectores a agentes de unión. Lo anterior puede conseguirse mediante reacción de los residuos aminoácidos del agente de unión, por ejemplo, la molécula de anticuerpo, incluyendo los grupos amina de lisina, los grupos de ácido carboxílico libres de ácido glutámico y ácido aspártico, los grupos sulfhidrilo de cisteína y las diversas fracciones de los aminoácidos aromáticos. Un método no específico utilizado habitualmente de unión covalente es la reacción de carbodiimida para unir un grupo carboxi (o amino) de un compuesto a grupos amino (o carboxi) del anticuerpo. Además, se han utilizado agentes bifuncionales, tales como dialdehídos o imidoésteres, para unir el grupo amino de un compuesto a grupos amino de una molécula de anticuerpo.

También se encuentra disponible para la unión de fármacos a agentes de unión la reacción de base de Schiff. Este método implica la oxidación con peryodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxi, formando de esta manera un aldehído que seguidamente se hace reaccionar con el agente de unión. La unión ocurre mediante formación de una base de Schiff con grupos amino del agente de unión. Otras técnicas son conocidas por el experto en la materia y pueden utilizarse para preparar los conjugados de anticuerpo-fármaco de la presente invención.

Un compuesto intermedio, que es el precursor del conector, puede hacerse reaccionar con el fármaco bajo condiciones apropiadas. Pueden utilizarse grupos reactivos en el fármaco y/o el compuesto intermedio. El producto de la reacción entre el fármaco y el compuesto intermedio, o el fármaco derivatizado, seguidamente se hace reaccionar con un anticuerpo anti-LY75 de la invención bajo condiciones apropiadas.

Se entenderá que también pueden realizarse modificaciones químicas en el compuesto deseado con el fin de que las reacciones de ese compuesto resulten más convenientes para los fines de preparar conjugados de la invención. Por



ejemplo, puede unirse un grupo funcional, p. ej., amina, hidroxilo o sulfhidrilo, al fármaco en una posición que presenta un efecto mínimo o aceptable sobre la actividad u otras propiedades del fármaco.

Normalmente, los compuestos de conjugado de anticuerpo-fármaco comprenden una unidad conectora entre la unidad de fármaco y la unidad de anticuerpo. En algunas realizaciones, el conector es cortable bajo condiciones intracelulares o extracelulares, de manera que el corte del conector libera la unidad de fármaco respecto del anticuerpo en el medio apropiado. Por ejemplo, los tumores sólidos que secretan determinadas proteasas pueden servir como la diana del conector cortable; en otras realizaciones, son las proteasas intracelulares las que se utilizan. En todavía otras realizaciones, la unidad conectora no es cortable y el fármaco se libera, por ejemplo, mediante degradación del anticuerpo dentro de lisosomas.

En algunas realizaciones, el conector es cortable por un agente de corte que está presente en el medio intracelulares (por ejemplo, dentro de un lisosoma, endosoma o caveola). El conector puede ser, por ejemplo, un conector peptidilo que es cortado por un enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo, aunque sin limitación, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunas realizaciones, el conector peptidilo es de por lo menos dos aminoácidos de longitud o de por lo menos tres aminoácidos de longitud, o más.

Entre los agentes de corte pueden incluirse, aunque sin limitación, las catepsinas B y D, y la plasmina, la totalidad de los cuales es conocido que hidrolizan derivados farmacéuticos dipéptido, resultando en la liberación del fármaco activo dentro de las células diana (ver, p. ej., Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Los conectores peptidilo son cortables por enzimas que están presentes en células expresantes de LY75. Por ejemplo, puede utilizarse un conector peptidilo que es cortable por la proteasa dependiente de tiol catepsina-B, que se expresa a nivel elevado en el tejido canceroso (p. ej., un conector Phe-Leu o Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:52)). Se describen otros ejemplos de dichos conectores en, p. ej., la patente US n.º 6.214.345.

En algunas realizaciones, el conector peptidilo cortable por una proteasa intracelular es un conector Val-Cit o un conector Phe-Lys (ver, p. ej., la patente US n.º 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el conector val-cit).

En otras realizaciones, el conector cortable es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a determinados valores del pH. Normalmente, el conector sensible al pH es hidrolizable bajo condiciones ácidas. Por ejemplo, puede utilizarse un conector lábil a ácidos que es hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetal o similar) (ver, p. ej., las patentes US n.º 5.122.368, n.º 5.824.805 y n.º 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661). Dichos conectores son relativamente estables bajo condiciones de pH neutro, tales como las presentes en la sangre, aunque son inestables a pH inferior a 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En determinadas realizaciones, el conector hidrolizable es un conector tioéter (tal como, p. ej., un tioéter unido al agente terapéutico mediante un enlace acilhidrazona (ver, p. ej., la patente US n.º 5.622.929).

En todavía otras realizaciones, el conector es cortable bajo condiciones reductoras (por ejemplo, un conector disulfuro). Se conoce de la técnica una variedad de conectores disulfuro, incluyendo, por ejemplo, aquellos que pueden formarse utilizando SATA (N-succinimidil-5-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridilditio)tolueno)-, SPDB y SMPT (ver, p. ej., Thorpe et al., 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzyniczak et al., en: *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C.W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Ver también la patente US n.º 4.880.935).

En otras realizaciones, el conector es un conector malonato (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), un conector maleimidobenzoílo (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304) o un análogo de 3'-N-amida (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12).

En todavía otras realizaciones, la unidad conectora no es cortable y el fármaco es liberado mediante degradación del anticuerpo (ver la publicación de patente US n.º 2005/0238649).

En muchas realizaciones, el conector es autoinmolable. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "espaciador autoinmolable" se refiere a una fracción química bifuncional que es capaz de unir covalentemente dos fracciones químicas espaciadas en una molécula tripartita estable. Se separará espontáneamente de la segunda fracción química si se corta su unión a la primera fracción. Ver, por ejemplo, los documentos n.º WO 2007/059404A2, n.º WO06/110476A2, n.º WO05/112919A2, n.º WO2010/062171, n.º WO09/017394, n.º WO07/089149, n.º WO07/018431, n.º WO04/043493 y n.º WO02/083180, que se refieren a conjugados de sustrato cortable por el fármaco, en donde el fármaco y sustrato cortable están unidos opcionalmente mediante un conector autoinmolable.

Con frecuencia, el conector no es sustancialmente sensible al medio extracelular. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "no sustancialmente sensible al medio extracelular", en el contexto de un conector, se refiere a que no más de aproximadamente 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 3 % o no más de aproximadamente 1 % de los conectores,

en una muestra de compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco, son cortados cuando el compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco está presente en un medio extracelular (por ejemplo, en el plasma).

Puede determinarse si un conector no es sustancialmente sensible al medio extracelular mediante, por ejemplo, incubación con plasma del compuesto conjugado de anticuerpo-fármaco durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y seguidamente cuantificando la cantidad de fármaco libre presente en el plasma.

En otras realizaciones no mutuamente excluyentes, el conector promueve la internalización celular. En determinadas realizaciones, el conector promueve la internalización celular en el caso de que esté conjugado con el agente terapéutico (es decir, en el medio de la fracción de conector-agente terapéutico del compuesto de conjugado de anticuerpo-fármaco tal como se describe en la presente memoria). En todavía otras realizaciones, el conector promueve la internalización celular en el caso de que esté conjugado tanto al compuesto auristatina como a los anticuerpos anti-LY75 de la invención.

Se describe una variedad de conectores de ejemplo que pueden utilizarse con las presentes composiciones y métodos en el documento n.º WO 2004/010957 y publicaciones US n.º 2006/0074008, n.º 20050238649 y n.º 2006/0024317. Preferentemente, el conector es SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato).

La carga de fármaco está representada por "p" y es el número medio de fracciones de fármaco por cada anticuerpo en una molécula. La carga de fármaco ("p") puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más fracciones (F) por anticuerpo, aunque frecuentemente el número medio es una fracción o un decimal. Generalmente, una carga de fármaco de entre 1 y 4 resulta frecuentemente útil, y entre 1 y 2 también resulta útil. Entre los CAF de la invención se incluyen colecciones de anticuerpos conjugados con un abanico de fracciones de fármaco, de 1 a 20, por ejemplo de 1 a 15, 1 a 10, 2 a 9, 3 a 8, 4 a 7 o 5 a 6. El número medio de fracciones de fármaco por anticuerpo en preparaciones de CAF de reacciones de conjugación puede caracterizarse por medios convencionales, tales como espectroscopía de masas y ensayo ELISA.

También puede determinarse la distribución cuantitativa de CAF en términos de "p". En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de CAF homogéneo en donde "p" es un determinado valor de CAF con cargas de otros fármacos puede conseguirse por medios tales como electroforesis.

Para algunos conjugados de anticuerpo-fármaco, "p" puede estar limitado por el número de sitios de unión en el anticuerpo. Por ejemplo, en el caso de que la unión sea mediante un tiol de cisteína, tal como en las realizaciones de ejemplo, anteriormente, un anticuerpo puede presentar solo uno o varios grupos tiol de cisteína, o puede presentar solo uno o varios grupos tiol suficientemente reactivos mediante los que puede unirse un conector. En determinadas realizaciones, una carga de fármaco más alta, p. ej.,  $p > 5$ , puede provocar agregación, insolubilidad, toxicidad o pérdida de permeabilidad celular de determinados conjugados de anticuerpo-fármaco. En determinadas realizaciones, la carga de fármaco para un CAF de la invención está comprendida entre 1 y aproximadamente 8, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 6, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 3,1 y aproximadamente 3,9, entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,8, entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,7, entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,6, entre aproximadamente 3,3 y aproximadamente 3,8, entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,7, entre aproximadamente 3,2 y aproximadamente 3,6, entre aproximadamente 3,3 y aproximadamente 3,8, o entre aproximadamente 3,3 y aproximadamente 3,7. En efecto, se ha mostrado que para determinados CAF, la proporción óptima de fracciones de fármaco por anticuerpo puede ser inferior a 8, y puede ser de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5 (ver el documento n.º US 2005/0238649 A1).

En determinadas realizaciones, se conjuga un número menor al máximo teórico de fracciones de fármaco con un anticuerpo durante una reacción de conjugación. Un anticuerpo puede contener, por ejemplo, residuos de lisina que no reaccionan con el compuesto intermedio conector de fármaco o reactivo conector, tal como se comenta posteriormente. Generalmente, los anticuerpos no contienen muchos grupos tiol de cisteína libres y reactivos que puedan unirse a una fracción de fármaco; en efecto, la mayoría de residuos tiol de cisteína en los anticuerpos existen en forma de puentes disulfuro. En determinadas realizaciones, un anticuerpo puede reducirse con un agente reductor, tal como ditioneitol (DTT) o tricarbonyltilfosfina (TCEP), bajo condiciones reductoras parciales o totales, para generar grupos tiol de cisteína reactivos. En determinadas realizaciones, un anticuerpo se somete a condiciones desnaturizantes para revelar grupos nucleofílicos reactivos, tales como lisina o cisteína.

La carga (proporción de fármaco/anticuerpo) de un CAF puede controlarse de diferentes maneras, p. ej., mediante: (i) limitación del exceso molar de compuesto intermedio de conector de fármaco o reactivo conector respecto a anticuerpo, (ii) limitación del tiempo o temperatura de la reacción de conjugación, (iii) condiciones reductoras parciales o limitantes para la modificación del tiol de cisteína, (iv) modificación mediante técnicas recombinantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo de manera que el número y posición de los residuos de cisteína se modifiquen para el control del número y/o posición de las uniones de conector-fármaco (tal como tioMab o tioFab, preparados tal como se da a conocer en la presente memoria y en el documento n.º WO2006/034488).

Debe entenderse que en donde reacciona más de un grupo nucleofílico con un compuesto intermedio conector de fármaco o reactivo conector, seguido de reactivo de fracción de fármaco, entonces el producto resultante es una mezcla de compuestos de CAF con una distribución de una o más fracciones de fármaco unidas a un anticuerpo. El número medio de fármacos por anticuerpo puede calcularse para la mezcla mediante un ensayo de anticuerpo de ELISA dual, que sea específico para el anticuerpo y específico para el fármaco. Pueden identificarse moléculas individuales de CAF en la mezcla mediante espectroscopía de masas y separarse mediante HPLC, p. ej., cromatografía de interacción hidrofóbica.

Puede aislarse un CAF homogéneo con un valor de carga único a partir de la mezcla de conjugación mediante electroforesis o cromatografía.

#### *Métodos para determinar el efecto citotóxico de los CAF*

Los métodos para determinar si un fármaco o conjugado de anticuerpo-fármaco ejerce un efecto citostático y/o citotóxico sobre una célula son conocidos. Generalmente puede medirse la actividad citotóxica o citostática de un conjugado de anticuerpo-fármaco mediante: exposición de células de mamífero que expresan una proteína diana del conjugado de anticuerpo-fármaco en un medio de cultivo celular; cultivo de las células durante un periodo de entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 5 días, y medición de la viabilidad celular. Pueden utilizarse ensayos in vitro basados en células para medir la viabilidad (proliferación), la citotoxicidad y la inducción de apoptosis (activación de caspasa) del conjugado de anticuerpo-fármaco.

Para determinar si un conjugado de anticuerpo-fármaco ejerce un efecto citostático, puede utilizarse un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, las células de cáncer que expresan un antígeno diana a una densidad de 5.000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos pueden cultivarse durante un periodo de 72 horas y exponerse a 0,5 µCi de <sup>3</sup>H-timidina durante las ocho horas finales del periodo de 72 horas. Se mide la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina en las células del cultivo en presencia y en ausencia del conjugado de anticuerpo-fármaco.

Para determinar la citotoxicidad, puede medirse la necrosis o la apoptosis (muerte celular programada). La necrosis normalmente se ve acompañada por una permeabilidad incrementada de la membrana plasmática, hinchamiento de la célula y ruptura de la membrana plasmática. La apoptosis se caracteriza generalmente por abultamientos de la membrana (en inglés, "blebbing"), condensación del citoplasma y activación de las endonucleasas endógenas. La determinación de cualquiera de estos efectos en las células de cáncer indica que un conjugado de anticuerpo-fármaco resulta útil en el tratamiento de cánceres.

La viabilidad celular puede medirse mediante determinación en una célula de la incorporación de un pigmento, tal como rojo neutro, azul tripán o azul ALAMAR<sup>TM</sup> (ver, p. ej., Page et al., 1993, Intl. J. Oncology 3:473-476). En dicho ensayo, las células se incuban en medio que contiene el pigmento, las células se lavan y el pigmento remanente, que refleja la incorporación celular del pigmento, se mide espectrofotométricamente. Para medir la citotoxicidad también puede utilizarse el pigmento de unión a proteínas sulforrodamina B (SRB) (Skehan et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-12).

Alternativamente, se utiliza una sal de tetrazolio, tal como MTT, en un ensayo colorimétrico cuantitativo de supervivencia y proliferación de células de mamífero mediante la detección de células vivas, pero no las muertas (ver, p. ej., Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63).

La apoptosis puede cuantificarse mediante la medición, por ejemplo, de la fragmentación del ADN. Se encuentran disponibles métodos fotométricos comerciales para la determinación in vitro cuantitativa de la fragmentación del ADN. Se describen ejemplos de tales ensayos, incluyendo el ensayo TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA, en Biochemica, 1999, n.º 2, páginas 34 a 37 (Roche Molecular Biochemicals).

También puede determinarse la apoptosis mediante la medición de cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, al igual que con la necrosis, puede determinarse la pérdida de la integridad de la membrana plasmática mediante la medición de la incorporación de determinados pigmentos (p. ej., un pigmento fluorescente tal como, por ejemplo, naranja acridina o bromuro de etidio). Un método para medir el número de células apoptóticas ha sido descrito por Duke y Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et al., editores, 1992, páginas 3.17.1 a 3.17.16). Las células también pueden marcarse con un pigmento del ADN (p. ej., naranja acridina, bromuro de etidio o yoduro de propidio) y observarse las células para la condensación de la cromatina y marginación a lo largo de la membrana nuclear interna. Entre otros cambios morfológicos que pueden medirse para determinar la apoptosis se incluyen, p. ej., la condensación citoplasmática, "blebbing" incrementado de la membrana y contracción celular.

La presencia de células apoptóticas puede medirse tanto en los compartimientos unidos como "flotantes" de los cultivos. Por ejemplo, pueden recogerse ambos compartimientos mediante separación del sobrenadante, tripsinizando las células unidas, combinando las preparaciones tras una etapa de lavado mediante centrifugación (p. ej., 10 minutos a 2.000 rpm) y detectando la apoptosis (p. ej., mediante medición de la fragmentación del ADN) (ver, p. ej., Piazza et al., 1995, Cancer Research 55:3110-16).

*In vivo*, puede evaluarse el efecto de una composición terapéutica del anticuerpo anti-LY75 de la invención en un modelo animal adecuado. Por ejemplo, pueden utilizarse modelos de cáncer xenogénicos, en los que se introducen en animales inmunocomprometidos, tales como ratones desnudos o SCID, explantes de cáncer o tejidos de xenoinjerto subcultivados (Klein et al., 1997, Nature Medicine 3:402-408). Puede medirse la eficacia utilizando ensayos que miden la inhibición de la formación de tumores, regresión de tumores o metástasis, y similares.

Las composiciones terapéuticas utilizadas en la práctica de los métodos anteriormente proporcionados pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un portador adecuado para el método de administración deseado. Entre los portadores adecuados se incluyen cualquier material que, en combinación con la composición terapéutica, conserve la función antitumoral de la composición terapéutica y sea generalmente no reactivo con el sistema inmunitario del paciente. Entre los ejemplos se incluyen, aunque sin limitación, cualquiera de varios portadores farmacéuticos estándares, tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato estériles, agua bacteriostática y similares (ver, generalmente, Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, A. Osal, Ed., 1980).

#### *Método para producir anticuerpos*

Los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria pueden prepararse mediante cualquier método adecuado. Entre estos métodos se incluyen el cultivo de una célula huésped que contiene el ácido o ácidos nucleicos aislados que codifican para los anticuerpos. Tal como apreciará el experto en la materia, lo anterior puede llevarse a cabo en una variedad de maneras, dependiendo de la naturaleza del anticuerpo. En el caso de que los anticuerpos sean anticuerpos tradicionales de longitud completa, por ejemplo, una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera bajo condiciones en las que se produce un anticuerpo y puede aislarse.

Las cadenas variables pesada y ligera de LY75\_A1 se dan a conocer en la presente memoria (tanto secuencias de proteína como de ácido nucleico); tal como se apreciará en la técnica, estas pueden potenciarse fácilmente para producir cadenas pesadas y ligeras de longitud completa. Es decir, tras proporcionar los fragmentos de ADN codificantes de los segmentos  $V_H$  y  $V_K$  tal como se describe en la presente memoria, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas estándares de ADN recombinante, por ejemplo, para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmento Fab, o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN codificante de  $V_K$  o  $V_H$  se liga operablemente a otro fragmento de ADN codificante de otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible. La expresión "operablemente ligado", tal como se utiliza en el presente contexto, pretende referirse a que los dos fragmentos de ADN se unen de manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN se mantienen en el mismo marco.

El ADN aislado codificante de la región  $V_H$  puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa mediante ligamiento operable del ADN codificante de  $V_H$  con otra molécula de ADN codificante de regiones constantes de cadena pesada ( $C_H1$ ,  $C_H2$  y  $C_H3$ ). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada murinos son conocidas de la técnica [ver, p. ej., Kabat, E.A. et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, US Department of Health and Human Services, publicación del NIH n.º 91-3242] y pueden obtenerse fragmentos de ADN que comprenden dichas regiones mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, aunque lo más preferentemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN codificante de  $V_H$  puede ligarse operablemente a otra molécula de ADN codificante de solo la región constante de cadena pesada  $C_H1$ .

El ADN aislado codificante de la región  $V_L/V_K$  puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera de Fab) mediante ligamiento operable del ADN codificante de  $V_L$  a otra molécula de ADN codificante de la región constante de cadena ligera,  $C_L$ . Las secuencias de los genes de región constante de cadena ligera murinos son conocidas de la técnica [ver, p. ej., Kabat, E.A. et al. (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, US Department of Health and Human Services, publicación del NIH n.º 91-3242] y pueden obtenerse fragmentos de ADN que comprenden dichas regiones, mediante amplificación por PCR estándar. En realizaciones preferentes, la región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen de scFv, los fragmentos de ADN codificantes de  $V_H$  y codificantes de  $V_L/V_K$  se ligan operablemente a otro fragmento codificante de un conector flexible, p. ej., codificante de la secuencia de aminoácidos (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, de manera que las secuencias de  $V_H$  y  $V_L/V_K$  pueden expresarse como una proteína de cadena sencilla contigua, con las regiones  $V_L/V_K$  y  $V_H$  unidas mediante el conector flexible [ver, p. ej., Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554].

Se proporcionan ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria. Dichos polinucleótidos codifican para tanto las regiones variables como las constantes de cada una de las cadenas pesada y ligera, aunque otras combinaciones también se encuentran contempladas de acuerdo con las composiciones descritas en la presente memoria.

Los polinucleótidos pueden encontrarse en la forma de ARN o ADN. Los polinucleótidos en la forma de ADN, ADNc, ADN genómico, análogos de ácidos nucleicos y ADN sintético también son utilizables. El ADN puede ser de doble cadena o de cadena sencilla, y si es de cadena sencilla, puede ser la cadena codificante (de sentido) o la cadena no codificante (antisentido). La secuencia codificante que codifica para el polipéptido puede ser idéntica a la secuencia codificante proporcionada en la presente memoria o puede ser una secuencia codificante diferente, la cual, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, codificante para los mismos polipéptidos que el ADN proporcionado en la presente memoria.

El ácido o ácidos nucleicos codificantes de los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria pueden incorporarse en vectores de expresión, que pueden ser extracromosómicos o diseñarse para la integración en el genoma de la célula huésped en la que se introducen. Los vectores de expresión pueden contener cualquier número de secuencias reguladoras apropiadas (incluyendo, aunque sin limitación, secuencias de control transcripcional y traduccional, promotores, sitios de unión ribosómica, intensificadores, orígenes de replicación, etc.) u otros componentes (genes de selección, etc.), la totalidad de los cuales están operablemente ligados tal como es bien conocido de la técnica. En algunos casos, se utilizan dos ácidos nucleicos y cada uno se introduce en un vector de expresión diferente (p. ej., la cadena pesada en un primer vector de expresión; la cadena ligera en un segundo vector de expresión), o alternativamente pueden introducirse en el mismo vector de expresión. El experto en la materia apreciará que el diseño del vector o vectores de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc.

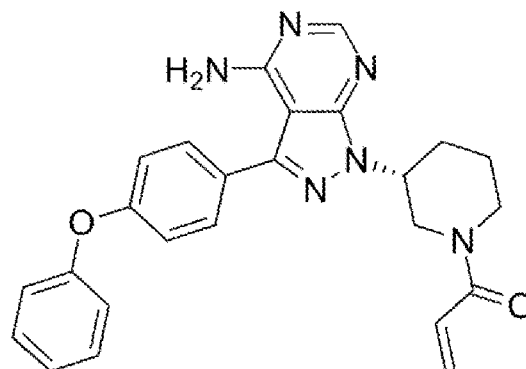
En general, los ácidos nucleicos y/o la expresión pueden introducirse en una célula huésped adecuada para generar una célula huésped recombinante utilizando cualquier método apropiado para la célula huésped seleccionada (p. ej., transformación, transfección, electroporación o infección), de manera que la molécula o moléculas de ácido nucleico estén operablemente ligadas a uno o más elementos de control de la expresión (p. ej., en un vector, en un constructo creado mediante procesos celulares, integrado en el genoma de la célula huésped). La célula huésped recombinante que resulta puede mantenerse bajo condiciones adecuadas para la expresión (p. ej., en la presencia de un inductor, en un animal no ser humano adecuado, en medio de cultivo adecuado suplementado con sales apropiadas, factores de crecimiento, antibióticos, suplementos nutricionales, etc.), de manera que se produzca el polipéptido o polipéptidos codificados. En algunos casos, las cadenas pesadas se producen en una célula y las cadenas ligeras, en otra.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes de expresión son conocidas de la técnica y entre ellas se incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, incluyendo, aunque sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), células HEK 293, células NSO, células HeLa, células renales de hámster neonato (BHK, por sus siglas en inglés), células renales de mono (COS, por sus siglas en inglés), células de carcinoma hepatocelular humano (p. ej., Hep G2) y varias otras líneas celulares. También pueden utilizarse células no de mamífero, incluyendo, aunque sin limitación, bacterianas, de levadura, de insecto y vegetales, para expresar anticuerpos recombinantes. Pueden producirse anticuerpos en animales transgénicos, tales como vacas o pollos.

Los métodos generales para la biología molecular, expresión, purificación y cribado de anticuerpos son bien conocidos, por ejemplo ver las patentes US n.º 4.816.567, n.º 4.816.397, n.º 6.331.415 y n.º 7.923.221, así como la obra Antibody Engineering, editada por Kontermann y Dubel, Springer, Heidelberg, 2001 y 2010; Hayhurst y Georgiou, 2001, Curr. Opin. Chem. Biol. 5:683-689; Maynard y Georgiou, 2000, Annu. Rev. Biomed. Eng. 2:339-76, y Morrison, S. (1985) Science 229:1202.

El componente (B) de la combinación farmacéutica reivindicada es ibrutinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El ibrutinib (Imbruvica®) es un fármaco de molécula pequeña que se une irreversiblemente a la tirosina quinasa de Bruton (BTK). Se ha utilizado anteriormente para tratar cánceres de células B, tales como el linfoma de células del manto, la leucemia linfocítica crónica y la macroglobulinemia de Waldenström (una forma de linfoma no Hodgkin). Se proporciona a continuación las fórmulas estructural y química del ibrutinib:

(R)-1-(3-(4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)prop-2-en-1-ona



El ibrutinib se comercializa bajo el nombre comercial de Imbruvica®. Se encuentra disponible en Pharmacytics, Inc. (EE. UU.).

#### *Composiciones farmacéuticas*

La combinación farmacéutica de la invención se encuentra en la forma de una preparación combinada para la utilización simultánea, separada o secuencial. La expresión "preparación combinada" incluyen tanto combinaciones fijadas como combinaciones no fijadas.

La expresión "combinación fija" se refiere a que los ingredientes activos (p. ej., los componentes (A) y (B)) se encuentran en la forma de una entidad o dosis única. En otras palabras, los ingredientes activos están presentes en una única composición o formulación.

La expresión "combinación no fija" se refiere a que los ingredientes activos (p. ej., los componentes (A) y (B)) están presentes en diferentes entidades o dosis (p. ej., como composiciones o formulaciones separadas), por ejemplo como un kit de partes. Los componentes independientes (A) y (B) en sus composiciones o formulaciones deseadas a continuación pueden administrarse por separado o secuencialmente, en el mismo momento o en momentos diferentes.

En el caso de que la administración sea secuencial, el retraso en la administración del segundo componente no debe ser tal que se pierda el beneficio del efecto que aparece por la utilización de la combinación. Por lo tanto, en una realización, el tratamiento secuencial implicada la administración de cada componente de la combinación dentro de un periodo de 11 días. En otra realización, este periodo es de 10 días. En otra realización, este periodo es de 9 días. En otra realización, este periodo es de 8 días. En otra realización, este periodo es de 7 días. En otra realización, este periodo es de 6 días o menos. En otra realización, este periodo es de 5 días o menos. En otra realización, este periodo es de 4 días o menos. En otra realización, este periodo es de 3 días o menos. En otra realización, este periodo es de 2 días o menos. En otra realización, este periodo es de 24 horas o menos. En otra realización, este periodo es de 12 horas o menos.

Los componentes (A) y (B) pueden administrarse en cualquier orden, p. ej., el componente (A) en primer lugar y después el componente (B); o el componente (B) en primer lugar y después el componente (A).

La proporción de las cantidades totales de componente (A) a componente (B) que van a administrarse en la preparación combinada puede modificarse, p. ej., con el fin de adaptarse a las necesidades de una subpoblación de pacientes que va a tratarse o las necesidades del paciente individual, las cuales pueden deberse a la edad, sexo, peso corporal, etc. de los pacientes.

Los componentes (A) y (B), ya sea presentes en una única composición o en composiciones separadas, pueden formularse independientemente con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Las combinaciones farmacéuticas de la invención pueden incluir, además, por lo menos otro agente antitumoral, o un agente antiinflamatorio o inmunosupresor. Los ejemplos de agentes terapéuticos que pueden utilizarse en terapia de combinación se describen en mayor detalle posteriormente en el apartado sobre usos de los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier y todo tipo de solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador resulta adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (p. ej., mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, inmunoconjugado o molécula biespecífica, puede recubrirse en un material para proteger el compuesto frente a la acción de ácidos y otras condiciones naturales que podrían inactivar el compuesto.

Los componentes (A) y/o (B) pueden encontrarse en la forma de una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y no imparte ningún efecto de toxicidad no deseado [ver, p. ej., Berge, S.M. et al. (1977), J. Pharm. Sci. 66:1-19]. Entre los ejemplos de tales sales se incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Entre las sales de adición de ácido se incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como los ácidos clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similares. Entre las sales de adición de base se incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilén-diamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Una combinación farmacéutica de la invención o parte de la misma puede incluir, además, un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Entre los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables se incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito

sódico, sulfito sódico y similares, (2) antioxidantes solubles en aceites, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA, por sus siglas en inglés), hidroxitolueno butilado (BHT, por sus siglas en inglés), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares, y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilén-diamín-tetracético (EDTA, por sus siglas en inglés), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Entre los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden utilizarse en las combinaciones farmacéuticas de la invención se incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante la utilización de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante la utilización de surfactantes.

Dichas combinaciones o partes de las mismas pueden contener, además, adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante procedimientos de esterilización, supra, y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico y similares. También puede resultar deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, puede provocarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Entre los portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocida de la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, está contemplada la utilización del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada a una concentración de fármaco elevada. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo mediante la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante la utilización de surfactantes. En muchos casos, resultará preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización mediante microfiltración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son el secado al vacío y el secado por congelación (liofilización) que rinden unos polvos del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada a esterilidad del mismo.

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosis única variará dependiendo del sujeto bajo tratamiento y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosis única generalmente será aquella cantidad de la composición que produzca un efecto terapéutico. Generalmente de 100 por ciento, esta cantidad estará comprendida entre aproximadamente 0,01 por ciento y aproximadamente 99 por ciento de ingrediente activo, preferentemente entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 70 por ciento, lo más preferentemente entre aproximadamente 1 por ciento y aproximadamente 30 por ciento de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosis se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (p. ej., una combinación sinérgica, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas durante el tiempo o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente tal como indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de las dosis. La forma de unidad de dosis tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que van a tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosis unitaria de la invención están dictadas y son directamente dependientes de: (a) las características

únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que debe conseguirse, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de formulación de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

Para la administración del anticuerpo anti-LY75, las dosis están comprendidas entre aproximadamente 0,0001 y 100 mg/kg, por ejemplo entre 0,001 y 50 mg/kg, entre 0,005 y 20 mg/kg, entre 0,01 y 10 mg/kg y más habitualmente, entre 0,01 y 5 mg/kg del peso corporal del huésped. Por ejemplo, las dosis pueden ser de 0,05 mg/kg de peso corporal, 0,1 mg/kg de peso corporal, 0,3 mg/kg de peso corporal, 0,5 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 2 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 4 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal, 6 mg/kg de peso corporal, 7 mg/kg de peso corporal, 8 mg/kg de peso corporal, 9 mg/kg de peso corporal, 10 mg/kg de peso corporal, 12 mg/kg de peso corporal, 15 mg/kg de peso corporal, 20 mg/kg de peso corporal, 25 mg/kg de peso corporal, 30 mg/kg de peso corporal, o dentro del intervalo de entre 0,1 y 20 mg/kg, de entre 0,5 y 15 mg/kg, de entre 1 y 10 mg/kg, de entre 2 y 8 mg/kg, de entre 3 y 7 mg/kg o de entre 4 y 6 mg/kg. Un régimen de tratamiento de ejemplo comprende la administración una vez al día, una vez cada dos días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada tres meses o una vez cada seis meses. Los regímenes de dosis preferentes para un anticuerpo anti-LY75 de la invención incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal mediante administración intravenosa, en donde el anticuerpo se administra utilizando uno de los programas de administración de dosis siguientes: (i) cada cuatro semanas para seis dosis, seguido de cada tres meses; (ii) cada tres semanas, (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez, seguido de 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunas realizaciones, la dosis de anticuerpo anti-LY75 (p. ej., LY75-DM4) se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de entre 0,01 y 1,5 nM o de entre 0,018 y 1,2 nM (p. ej., de aproximadamente 0,018, 0,037, 0,075, 0,15, 0,3, 0,6 o 1,2 nM). Preferentemente, el anticuerpo anti-LY75 se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de entre 0,03 nM y 0,30 nM.

En algunas realizaciones, la dosis de ibrutinib se ajusta para alcanzar una concentración en plasma de entre aproximadamente 15,6 y 1.000 nM (p. ej., de aproximadamente 15,6, 31,2, 62,5, 125, 250, 500 o 1.000 nM). En otras realizaciones, la dosis de ibrutinib se ajusta para alcanzar una concentración en plasma de entre aproximadamente 1,56 y 100 nM (p. ej., de aproximadamente 1,5, 3,1, 6,2, 12,5, 25, 50 o 100 nM). La dosis de ibrutinib puede ser de aproximadamente 560 mg (p. ej., cuatro cápsulas de 140 mg). Puede administrarse por vía oral. En algunas realizaciones, la dosis de ibrutinib es de aproximadamente 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg o 500 mg.

Preferentemente, la combinación de componentes (A) y (B) es una combinación sinérgica. El experto en la materia entenderá que una combinación sinérgica es una en la que el efecto de la combinación es mayor que la suma de los efectos de los componentes individuales. La sinergia puede cuantificarse utilizando el índice de combinación (IC) de Chou-Talalay (ver "Evaluation of combination chemotherapy: integration of nonlinear regression, curve shift, isobologram, and combination index analyses", Zhao L. et al., Clin. Cancer Res. (2004), Dec 1;10(23):7994-8004; y "Computerized quantitation of synergism and antagonism of taxol, topotecan, and cisplatin against human teratocarcinoma cell growth: a rational approach to clinical protocol design", Chou TC, Motzer RJ, Tong Y, Bosl GJ, J. Natl. Cancer Inst. (1994) Oct 19;86(20):1517-24). Este método de índice de combinación (IC) se basa en la ecuación de múltiples efectos farmacológicos derivados del principio del efecto mediano de la ley de acción de masas. Lo anterior proporciona una definición cuantitativa para sinergia fuerte ( $IC < 0,3$ ), sinergia ( $IC = 0,3$  a  $0,9$ ), efecto aditivo ( $IC = 0,9$  a  $1,1$ ) o antagonismo/ausencia de beneficio ( $IC > 1,1$ ), y proporciona el algoritmo para el programa informático de simulación automatizada de combinaciones de fármacos. Considera tanto la potencia (el valor  $D(m)$ ) como la forma de la curva de dosis-efecto (el valor "m") de cada fármaco solo y su combinación. El índice de combinación (IC) de Chou-Talalay puede estimarse utilizando el paquete Synergy R (ver "Preclinical versus Clinical Drugs Combination Studies", Chou TC, Leuk. Lymphoma. (2008);49(11):2059-2080, y referencias en el mismo). El IC de la combinación puede someterse a ensayo en una línea celular adecuada, p. ej., en líneas celulares CBA-LCBGD (tales como TMD8 o HBL1), p. ej., bajo las condiciones utilizadas en el Ejemplo 26.

Preferentemente, la combinación farmacéutica de la invención es una combinación sinérgica en la que el índice de combinación (IC) de Chou-Talalay es inferior a 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3 o 0,2. Preferentemente, el IC está comprendido entre 0,1 y 0,5, entre 0,1 y 0,3 o entre 0,1 y 0,2.

En particular, se proporciona una combinación farmacéutica de la invención para la utilización según se reivindica en la reivindicación 1, en la que se administran cantidades sinérgicas de los componentes (A) y (B) simultáneamente, por separado o secuencialmente al paciente. Preferentemente, se administran cantidades de los componentes (A) y (B) al paciente con el fin de proporcionar las concentraciones en plasma indicadas anteriormente.

Los anticuerpos normalmente se administran en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosis individuales pueden ser, por ejemplo, diarios, dos veces a la semana, semanales, mensuales, cada tres meses, cada seis meses, o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, tal como indique la medición de niveles sanguíneos del anticuerpo contra el antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosis se ajusta para conseguir una concentración de anticuerpo en plasma de entre aproximadamente 1 y 1.000  $\mu\text{g/ml}$ , de entre 5 y 750  $\mu\text{g/ml}$ , de entre 10 y 600  $\mu\text{g/ml}$ , de entre 15 y 500  $\mu\text{g/ml}$ , de entre 20 y 400  $\mu\text{g/ml}$ , y en algunos métodos, de entre aproximadamente 25 y 300  $\mu\text{g/ml}$ .



Alternativamente, el anticuerpo anti-LY75 puede administrarse en forma de formulaciones de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos muestran la semivida más larga, seguido de los anticuerpos humanizados, los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos no humanos. La dosis y la frecuencia de la administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, se administra una dosis relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento para el resto de su vida. En aplicaciones terapéuticas, en ocasiones se requiere una dosis relativamente elevada a intervalos relativamente cortos, hasta reducir o detener la progresión de la enfermedad, y preferentemente hasta que el paciente muestre una mejora parcial o total de los síntomas de la enfermedad. Después, el paciente puede recibir la administración de un régimen profiláctico.

Los niveles de dosis reales de los ingredientes activos en las combinaciones farmacéuticas de la presente invención pueden modificarse de manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que resulte eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin resultar tóxica para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención utilizadas, o del éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se utilice, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares utilizadas, la edad, sexo, peso, afección, estado general de salud y antecedentes médicos del paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos de las técnicas médicas.

Una "dosis terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-LY75 preferentemente resulta en una reducción de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un incremento en la frecuencia y duración de los periodos de la enfermedad libres de síntomas, o una prevención del deterioro o discapacidad debido a la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de los tumores mediados por LY75, una "dosis terapéuticamente eficaz" preferentemente inhibe el crecimiento celular o crecimiento tumoral en por lo menos aproximadamente 20 %, por lo menos aproximadamente 30 %, más preferentemente en por lo menos aproximadamente 40 %, por lo menos aproximadamente 50 %, todavía más preferentemente en por lo menos aproximadamente 60 %, por lo menos aproximadamente 70 %, y todavía más preferentemente en por lo menos aproximadamente 80 % o por lo menos aproximadamente 90 %, respecto a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto de inhibir el crecimiento tumoral puede evaluarse en un sistema modelo animal predictivo de eficacia en tumores humanos. Alternativamente, dicha propiedad de una composición puede evaluarse mediante el examen de la capacidad del compuesto de inhibir el crecimiento celular; dicha inhibición puede medirse in vitro mediante ensayos conocidos por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño tumoral, o alternativamente, mejorar los síntomas en un sujeto. El experto habitual en la materia podrá determinar dichas cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o la vía de administración seleccionada.

Puede administrarse una combinación farmacéutica de la presente invención mediante una o más vías de administración utilizando uno o más de una variedad de métodos conocidos de la técnica. Los componentes (A) y (B) pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes. Tal como apreciará el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Entre las vías de administración preferente para los anticuerpos de la invención se incluyen las vías de administración intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras parenterales, por ejemplo mediante inyección o infusión. La expresión "administración parenteral" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a modos de administración diferente de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, aunque sin limitación, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Alternativamente, el anticuerpo anti-LY75 puede administrarse por una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán al compuesto frente a la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etilén-vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones han sido patentados o son generalmente conocidos por el experto en la materia [ver, p. ej., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (1978) J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y.].

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos de la técnica. Por ejemplo, en una realización preferente, el componente (A) y/o B pueden administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos dados a conocer en las patentes US n.º 5.399.163, n.º 5.383.851, n.º 5.312.335, n.º 5.064.413, n.º 4.941.880, n.º 4.790.824 o n.º 4.596.556. Entre los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención se incluyen: la patente US n.º 4.487.603, que da a conocer una bomba de

microinfusión implantable para dispensar medicación a una tasa controlada; la patente US n.º 4.486.194, que da a conocer un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente US n.º 4.447.233, que da a conocer una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una tasa de infusión precisa; la patente US n.º 4.447.224, que da a conocer un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración de fármaco en continuo; la patente US n.º 4.439.196, que da a conocer un sistema de administración de fármaco osmótico que presenta compartimientos multicámara, y la patente US n.º 4.475.196, que da a conocer un sistema de administración de fármaco osmótico. El experto en la materia conocerá muchos otros de tales sistemas y módulos de administración implantados.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-LY75 puede formularse para garantizar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematocefálica (BHC) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos crucen la BHC (si se desea), pueden formularse en, por ejemplo, liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, ver, p. ej., las patentes US n.º 4.522.811, n.º 5.374.548 y n.º 5.399.331. Los liposomas pueden comprender una o más fracciones que son selectivamente transportadas al interior de células u órganos específicos, potenciando de esta manera la administración dirigida de fármacos [ver, p. ej., V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685]. Entre las fracciones de direccionamiento de ejemplo se incluyen el folato o la biotina (ver, p. ej., la patente US n.º 5.416.016); manósidos [Umezawa et al. (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038]; anticuerpos [P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180]; receptor de proteína A surfactante [Briscoe et al. (1995), Am. J. Physiol. 1233:134]; p120 [Schreier et al. (1994), J. Biol. Chem. 269:9090]; ver también K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273.

#### Usos y métodos

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" pretende incluir animales seres humanos y no seres humanos. Entre los animales no seres humanos se incluyen todos los vertebrados, p. ej., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles. Entre los sujetos preferentes se incluyen pacientes humanos que presentan trastornos mediados por la actividad de LY75 y/o la actividad de CD20.

Los métodos resultan particularmente adecuados para el tratamiento de pacientes humanos que presentan un trastorno asociado a la expresión aberrante de LY75 y/o la expresión de CD20. Dada la expresión de LY75 sobre las células tumorales, pueden utilizarse las combinaciones y métodos de la presente invención para tratar un sujeto con un trastorno tumorigénico, p. ej., un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales expresantes de LY75, o en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de tal trastorno, incluyendo, por ejemplo, leucemia, incluyendo leucemia linfocítica crónica y leucemia mieloide aguda, linfoma no Hodgkin, incluyendo LCBGD, linfoma de células B, linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de tejido linfóide asociado a mucosas (LTLAM), linfoma de células B rico en células T/histiocitos, linfoma de Burkitt, linfoma linfoplasmocítico, linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma de la zona marginal, linfoma de células T, linfoma de células T periféricas, linfoma de células grandes anaplásicas y el linfoma de células T angioinmunoblástico. Se ha demostrado que LY75 es internalizado al unirse a anticuerpo, tal como se ilustra en los Ejemplos 5 y 7, posteriormente, permitiendo de esta manera la utilización de anticuerpos anti-LY75 en cualquier mecanismo de acción de carga, p. ej., un enfoque de CAF, radioinmunoconjugado o enfoque ADEPT.

Los anticuerpos anti-LY75, generalmente administrados en forma de CAF, pueden utilizarse para inhibir o bloquear la función de LY75 que, a su vez, puede asociarse a la prevención o mejora de determinados síntomas de enfermedad, implicando de esta manera a LY75 como un mediador en la enfermedad. Lo anterior puede conseguirse mediante la puesta en contacto de una muestra y una muestra de control con el anticuerpo anti-LY75 bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y LY75. Cualesquiera complejos formados entre el anticuerpo y LY75 pueden detectarse y compararse en la muestra y el control.

Las vías adecuadas de administración de las composiciones de anticuerpo (p. ej., anticuerpos monoclonales e inmunoconjugados) *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas de la técnica y pueden ser seleccionadas por el experto habitual en la materia. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos pueden administrarse mediante inyección (p. ej., intravenosa o subcutánea). Las dosis adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y peso del sujeto y de la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpos.

Tal como se ha descrito anteriormente, el anticuerpo anti-LY75 puede coadministrarse con otro u otros agentes terapéuticos, p. ej., un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede unirse al agente (en forma de un complejo inmunitario) o puede administrarse por separado del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o concurrentemente con el agente, o puede coadministrarse con otras terapias conocidas, p. ej., una terapia anticáncer, p. ej., radiación. Entre dichos agentes terapéuticos se incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos, tales como doxorubicina (adriamicina), sulfato cisplatino-bleomicina, carmustina, clorambucilo y ciclofosfamida hidroxide, que, por sí mismos, solo resultan eficaces a niveles que son tóxicos o subtóxicos para el paciente. El cisplatino se administra por vía intravenosa en forma de una dosis de 100 mg/kg una vez cada cuatro semanas y la adriamicina se administra por vía intravenosa en forma de

una dosis de 60 a 75 mg/ml cada 21 días. Entre otros agentes adecuados para la coadministración con los anticuerpos de la invención se incluyen otros agentes utilizados para el tratamiento de cánceres, p. ej., cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer prostático, cáncer mamario, cáncer ovárico o cáncer pulmonar, tal como Avastin®, 5FU y gemcitabina. La coadministración de los anticuerpos anti-LY75 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticáncer que funcionan mediante mecanismos diferentes y proporcionan un efecto citotóxico sobre las células tumorales humanas. Dicha coadministración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que los convertiría en no reactivos con el anticuerpo.

Las combinaciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse junto con suero y/o complemento. Estas composiciones pueden resultar ventajosas en el caso de que el complemento esté localizado en estrecha proximidad a los anticuerpos. Alternativamente, los anticuerpos, y el complemento o suero, pueden administrarse por separado.

De acuerdo con lo anterior, los pacientes tratados con combinaciones farmacéuticas de la invención pueden recibir la administración adicional (antes, simultáneamente o después de la administración de un anticuerpo dado a conocer en la presente memoria) de otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que potencie o incremente el efecto terapéutico de los anticuerpos.

En otras realizaciones, el sujeto puede ser tratado adicionalmente con un agente que module, p. ej., potencie o inhiba, la expresión o actividad de Fcγ o receptores de Fcγ mediante, por ejemplo, el tratamiento del sujeto con una citoquina. Entre las citoquinas preferentes para la administración durante el tratamiento con la molécula multiespecífica se incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), interferón-γ (IFN-γ) y factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés).

La discusión de las referencias en la presente memoria pretende meramente resumir las afirmaciones realizadas por sus autores y no se hace ninguna admisión de que cualquier referencia constituya técnica anterior y el solicitante se reserva el derecho de impugnar la exactitud y pertinencia de las referencias citadas.

Los Ejemplos a continuación ilustran el contexto técnico de la invención. Solo el Ejemplo 26 se refiere a realizaciones de la invención.

#### *Ejemplo 1: generación de anticuerpos monoclonales humanos contra el antígeno LY75.*

Siguiendo procedimientos estándares, se inmunizaron ratones (IgG1 de xenorratón) con células CHO transfectadas con LY75 de longitud completa.

La especificidad de los anticuerpos generados contra LY75 se sometió a ensayo mediante citometría de flujo en células HEK293 transfectadas con LY75 y posteriormente en células HT29 expresantes de LY75. Con el fin de someter a ensayo la capacidad de los anticuerpos de unirse a la proteína LY75 de superficie celular, los anticuerpos se incubaron con las células expresantes de LY75. Las células se lavaron en tampón FACS (DPBS, FBS al 2 %), se centrifugaron y se resuspendieron en 100 µl del anticuerpo primario de LY75 diluido (también diluido en tampón de FACS). El complejo de anticuerpo-línea celular se incubó sobre hielo durante 60 min y después se lavó dos veces con tampón de FACS tal como se ha indicado anteriormente. El pellet de células-anticuerpos se resuspendió en 100 µl del anticuerpo secundario diluido (también diluido en tampón de FACS) y se incubó sobre hielo durante 60 min. El pellet se lavó tal como anteriormente y se resuspendió en 200 µl de tampón de FACS. Las muestras se cargaron en el citómetro de flujo BD FACScanto II y los datos se analizaron utilizando el software BD FACSdiva (resultados no mostrados).

#### *Ejemplo 2: caracterización estructural de anticuerpos monoclonales contra LY75.*

Las secuencias de ADNc codificantes de las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo monoclonal LY75\_A1 se obtuvieron utilizando técnicas de PCR estándar y se secuenciaron utilizando técnicas estándares de secuenciación del ADN.

Las secuencias de los anticuerpos pueden mutagenizarse para la reversión de vuelta a residuos de línea germinal en uno o más residuos.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las región variable de cadena pesada de LY75\_A1 se muestran en las SEQ ID NO:3 y 1, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la región variable de cadena ligera de LY75\_A1 se muestran en la SEQ ID NO:4 y 2, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada de LY75\_A1 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana demostró que la cadena pesada de LY75\_A1 utiliza un segmento V<sub>H</sub> de la V<sub>H</sub> 3-15 de línea germinal humana y un segmento J<sub>H</sub> de la línea germinal J<sub>H</sub> humana JH4. El análisis adicional de la secuencia de V<sub>H</sub> de LY75\_A1 utilizando el sistema de Kabat de determinación de regiones CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada, tal como se muestra en las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V<sub>H</sub> de CDR1, CDR2 y CDR3 de LY75\_A1 con la secuencia V<sub>H</sub> 3-15 de línea germinal y J<sub>H</sub> de línea germinal JH4 se muestran en la figura 1.

Las comparaciones de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de LY75\_A1 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de línea germinal humanas demuestran que la cadena ligera de LY75\_A1 utiliza un segmento V<sub>K</sub> de V<sub>K</sub> O12 de línea germinal humana y un segmento J<sub>K</sub> de la línea germinal humana J<sub>K</sub> JK4. El análisis adicional de la secuencia de V<sub>K</sub> de LY75\_A1 utilizando el sistema de Kabat de determinación de regiones CDR condujo a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera tal como se muestra en las SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente. Las alineaciones de las secuencias V<sub>K</sub> de CDR1, CDR2 y CDR3 de LY75\_A1 con las secuencias de V<sub>K</sub> O12 de línea germinal y J<sub>K</sub> JK4 de línea germinal se muestran en la figura 2.

### *Ejemplo 3: inmunohistoquímica utilizando anticuerpo monoclonal contra LY75.*

Utilizando los anticuerpos monoclonales humanos específicos para LY75, se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico de pellets celulares fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés) de células HT-29 y A549, matrices FFPE de linfoma no Hodgkin y de cáncer pancreático, y secciones recién congeladas de tumores de linfoma/leucemia, cáncer ovárico, cáncer pancreático y cáncer mamario, y una matriz de tejidos normales.

### **Materiales y métodos**

#### **Materiales**

Xilenos (X5P-1gal) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.

Histoprep etanol al 100 % (HC-800-1GAL) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.

Tampón de citrato 10x para la recuperación de epítomos inducida por calor (AP9003125) de Thermo Scientific, MA, EE. UU.

Supresor de peroxidasa Thermo Scientific \*Pierce\* (35000), de Thermo Scientific, MA, EE. UU.

Bloqueador de proteína sin suero (X0909) de Dako, CA, EE. UU.

Anticuerpo secundario: conjugado de anticuerpo de cabra anti-Fab de IgG humana-FITC (109-097-003) de Jackson ImmunoResearch, PA, EE. UU.

IgG humana Chrome pure, molécula completa (09-000-003) de Jackson ImmunoResearch, PA, EE. UU.

Anticuerpo terciario: de artón anti-FITC (ab10257) de Abcam, MA, EE. UU.

IgG humana purificada de control de isotipo (1-001A) de R&D Systems, MN, EE. UU.

Tween-20 (BP337-100) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.

Acetona (BP2403-4) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.

Polímero conjugado con HRP Dual Link EnVision+, de ratón y conejo (K4063) de Dako, CA, EE. UU.

Kit de solución DAB 2 (882014) de Invitrogen, NY, EE. UU.

Hematoxilina de Harris (23-245-677) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.

Medio de montaje de Faramount (S302580) de Dako, CA, EE. UU.

Las secciones y matrices de tejidos se adquirieron de US Biomax Inc., MD, EE. UU., o de Origene, MD, EE. UU.

Preparación de portaobjetos FFPE: desparafinado y rehidratación.

Los portaobjetos de FFPE se desparafinaron en xileno (2x3 minutos) y después se rehidrataron con xileno 1:1: etanol al 100 % (1x3 minutos), etanol al 100 % (2x3 minutos), etanol al 95 % (1x3 minutos), etanol al 70 % (1x3 minutos), etanol al 50 % (1x3 minutos) y agua corriente (1x3 minutos).

Preparación de portaobjetos FFPE: recuperación de antígenos (microondas).

El antígeno LY75 se recuperó utilizando calor de microondas, a alta potencia, hasta la ebullición, seguido de baja potencia durante 10 minutos en 50 ml de tampón de citrato 1x en un frasco Coplin. A continuación, se dejó que los portaobjetos se enfriaran hasta la temperatura ambiente durante 15 min adicionales y después se lavaron en agua corriente durante 3 minutos. Se dibujaron círculos en torno a cada sección de tejido/micromatriz de tejidos (TMA, por sus siglas en inglés) con un lápiz de barrera hidrofóbica y los portaobjetos seguidamente se lavaron 3 veces en PBS, 3 minutos cada lavado.

Preparación de portaobjetos FF.

Se sacaron los portaobjetos del almacenamiento a -80 °C y se dejaron secar a temperatura ambiente en la campana de humos durante 20 a 30 minutos. Se fijaron los portaobjetos durante 10 min en acetona helada a -20 °C y seguidamente se dejaron secar durante 20 min en la campana de humos a temperatura ambiente. Se lavaron los portaobjetos y se rehidrataron en PBS, 3 lavados durante 3 min cada uno. Las secciones se delinearon con un lápiz de barrera hidrofóbica.

Preparación de complejos de anticuerpos.

Se diluyó el anticuerpo anti-LY75 primario en bloqueador de proteínas sin suero (SFPB, por sus siglas en inglés) para obtener una solución con una concentración 20 veces mayor que la concentración deseada final (20 µg/ml para 1 µg/ml final). El anticuerpo secundario, fragmento de unión a antígeno (Fab) de cabra anti-inmunoglobulina G (IgG) humana, se preparó de manera similar en SFPB para generar una solución de igual concentración.

Se agruparon volúmenes iguales de anticuerpos primarios y secundarios en un tubo etiquetado, se mezclaron suavemente y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente, resultando en una concentración de anticuerpo primario 10 veces mayor que la concentración final deseada (10 µg/ml para 1 µg/ml final). Esta mezcla se diluyó 1:5 con SFPB, se mezcló suavemente y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, resultando en una concentración de anticuerpo primario dos veces la de la concentración final deseada (2 µg/ml para 1 µg/ml final).

Para producir los complejos de tinción finales, se preparó una solución al 1 % (10 µg/µl) de IgG humana en SFPB y se añadió un volumen igual a la mezcla de anticuerpos primarios/secundarios. Esta combinación se mezcló suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, diluyendo a la mitad la concentración de anticuerpo primario de la mezcla de anticuerpos primarios/secundarios y resultando en la concentración final de anticuerpo primario deseada (1 µg/ml).

#### *Inmunotinción*

Por otra parte, se bloqueó la actividad endógena de peroxidasa tisular mediante la incubación de tejidos con supresor de peroxidasa durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente (TA) en una cámara humidificada. A continuación, se lavaron los portaobjetos en PBS 3x, 3 minutos cada vez. Los tejidos se incubaron en SFPB durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Los complejos de tinción finales se aplicaron a cada sección y/o micromatriz de tejidos y los portaobjetos se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en una cámara humidificada. A continuación, los portaobjetos se lavaron una vez en PBS y una vez en PBST (PBS+Tween-20 al 0,125 %), 3 minutos cada lavado. El anticuerpo terciario de ratón anti-FITC se aplicó a una concentración de 2 µg/ml durante 30 min, a temperatura ambiente, en una cámara humidificada. Seguidamente, las secciones se lavaron una vez en PBS y una vez en PBST, 3 min cada lavado. A continuación, se aplicó polímero conjugado con HRP Dual Link Envision+ antirrátón/conejo en los tejidos y los portaobjetos se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente en una cámara humidificada. A continuación, los portaobjetos se lavaron una vez en PBS, una vez en PBST, 3 minutos cada lavado. Los tejidos se incubaron en solución de DAB preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a temperatura ambiente durante 10 min. Seguidamente, los portaobjetos se lavaron una vez en agua corriente durante 2 minutos y una vez en PBS durante 3 minutos. Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina durante 30 segundos a temperatura ambiente y se lavaron con agua corriente. Los portaobjetos se secaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y los cubreobjetos seguidamente se montaron sobre los portaobjetos utilizando medio de montaje de Faramount.

#### *Resultados*

LY75\_A1 mostraron positividad en muestras de cáncer de mama triple negativos FFPE, en donde el 77 % de las secciones mostraron tinción positiva y el 55 % mostró tinción robusta (+++).

La tinción para LY75 en tejidos normales FF era generalmente nula a baja. El epitelio ductal de mama, glándulas salivales y páncreas mostraba tinción marcadamente baja a moderada, y el bazo presentó tinción débilmente positiva. Por lo tanto, los anticuerpos con diana en LY75 podrían presentar utilidad como terapéuticos y diagnósticos en algunos de los cánceres sometidos a ensayo y posiblemente otros tipos de cáncer que muestran expresión de LY75.

*Ejemplo 4: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 en células HT-29.*

#### *Materiales*

Disociador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, EE. UU.

#### *Método*

Las células se disociaron utilizando disociador celular y se realizó un recuento. Se centrifugaron  $5 \times 10^3$  células/pocillo hasta formar un pellet (para las células en suspensión, pueden utilizarse más, dependiendo del tiempo de duplicación de las células, tal como  $10^3$  células/pocillo). El pellet se resuspendió en medio de cultivo hasta una concentración de  $10^5$  células/ml.

Se añadieron 50 µl/pocillo de suspensión celular a los pocillos de una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo transparente. Los anticuerpos se diluyeron y titularon a 8 puntos (titulaciones de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0 y 20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Se añadieron anticuerpo diluidos o medios (para las muestras no tratadas) (50 µl/pocillo) a los pocillos apropiados. Se añadió exceso de medio (200 µl/pocillo) a las filas y columnas exteriores de la placa para prevenir la evaporación. La placa se incubó durante 72 h a 37 °C.

Se sacó la placa del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por otra parte, se descongeló la solución Cell Titer Glo. Se agitó la placa y se lavó 1x con 100 µl/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifugó en primer lugar para sedimentar las células). Se añadieron 100 µl/pocillo de PBS y 100 µl de Cell Titer Glo a cada pocillo y se trituraron para mezclar. La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para garantizar que ocurría una lisis celular eficiente. A continuación, la placa se leyó en un luminómetro Glomax.

## Resultados

Los resultados ilustrados en la figura 3a muestran una subpoblación de anticuerpos, que era conocido que se unían a LY75, que pueden inducir la muerte celular de células HT-29. Lo anterior sugiere que, aunque los anticuerpos pueden unirse a LY75, solo unos cuantos muestran eficacia al conjugarlos con DM1. A continuación, se seleccionaron anticuerpos de la subpoblación para un análisis adicional de la actividad citotóxica.

*Ejemplo 5: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en células de cáncer colorrectal.*

## Materiales

Disociador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, EE. UU.

## Método

Las células se disociaron utilizando disociador celular y se realizó un recuento. Se centrifugaron  $5 \times 10^3$  células/pocillo hasta formar un pellet (para las células en suspensión, pueden utilizarse más, dependiendo del tiempo de duplicación de las células, tal como  $10^3$  células/pocillo). El pellet se resuspendió en medio de cultivo hasta una concentración de  $10^5$  células/ml.

Se añadieron 50 µl/pocillo de suspensión celular a los pocillos de una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo transparente. Los anticuerpos se diluyeron y titularon a 8 puntos (titulaciones de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0 y 20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Se añadieron anticuerpo diluidos o medios (para las muestras no tratadas) (50 µl/pocillo) a los pocillos apropiados. Se añadió exceso de medio (200 µl/pocillo) a las filas y columnas exteriores de la placa para prevenir la evaporación. La placa se incubó durante 72 h a 37 °C.

Se sacó la placa del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por otra parte, se descongeló la solución Cell Titer Glo. Se agitó la placa y se lavó 1x con 100 µl/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifugó en primer lugar para sedimentar las células). Se añadieron 100 µl/pocillo de PBS y 100 µl de Cell Titer Glo a cada pocillo y se trituraron para mezclar. La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para garantizar que ocurría una lisis celular eficiente. A continuación, la placa se leyó en un luminómetro Glomax.

## Resultados

La figura 3b muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células HT-29. Estos resultados demuestran un incremento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpo y otros anticuerpos anti-LY75 conjugados con una toxina (seleccionados del Ejemplo 1).

*Ejemplo 6: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en líneas celulares de linfoma.*

## Materiales

Disociador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, EE. UU.

## Método

Las células se disociaron utilizando disociador celular y se realizó un recuento. Se centrifugaron  $5 \times 10^3$  células/pocillo hasta formar un pellet (para las células en suspensión, pueden utilizarse más, dependiendo del tiempo de duplicación de las células, tal como  $10^3$  células/pocillo). El pellet se resuspendió en medio de cultivo hasta una concentración de  $10^5$  células/ml.

Se añadieron 50 µl/pocillo de suspensión celular a los pocillos de una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo transparente. Los anticuerpos se diluyeron y titularon a 8 puntos (titulaciones de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0 y 20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Se añadieron anticuerpo diluidos o medios (para las muestras no tratadas) (50 µl/pocillo) a los pocillos apropiados. Se añadió exceso de medio (200 µl/pocillo) a las filas y columnas exteriores de la placa para prevenir la evaporación. La placa se incubó durante 72 h a 37 °C.

Se sacó la placa del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por otra parte, se descongeló la solución Cell Titer Glo. Se agitó la placa y se lavó 1x con 100 µl/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifugó en primer lugar para sedimentar las células). Se añadieron 100 µl/pocillo de PBS y 100 µl de Cell Titer Glo a cada pocillo y se trituraron para mezclar. La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para garantizar que ocurría una lisis celular eficiente. A continuación, la placa se leyó en un luminómetro Glomax.

## Resultados

La figura 3c muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células RAJI. La figura 3d muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células Namalwa. La figura 3e muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células Karpas 299. Estos resultados demuestran un incremento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpo y otros anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 (seleccionados del Ejemplo 1).

*Ejemplo 7: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en líneas celulares de cáncer pancreático.*

## Materiales

Disociador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, EE. UU.

## Método

Las células se disociaron utilizando disociador celular y se realizó un recuento. Se centrifugaron  $5 \times 10^3$  células/pocillo hasta formar un pellet (para las células en suspensión, pueden utilizarse más, dependiendo del tiempo de duplicación de las células, tal como  $10^3$  células/pocillo). El pellet se resuspendió en medio de cultivo hasta una concentración de  $10^5$  células/ml.

Se añadieron 50 µl/pocillo de suspensión celular a los pocillos de una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo transparente. Los anticuerpos se diluyeron y titularon a 8 puntos (titulaciones de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0 y 20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Se añadieron anticuerpo diluidos o medios (para las muestras no tratadas) (50 µl/pocillo) a los pocillos apropiados. Se añadió exceso de medio (200 µl/pocillo) a las filas y columnas exteriores de la placa para prevenir la evaporación. La placa se incubó durante 72 h a 37 °C.

Se sacó la placa del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por otra parte, se descongeló la solución Cell Titer Glo. Se agitó la placa y se lavó 1x con 100 µl/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifugó en primer lugar para sedimentar las células). Se añadieron 100 µl/pocillo de PBS y 100 µl de Cell Titer Glo a cada pocillo y se trituraron para mezclar. La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante

15 minutos y se visualizó mediante microscopía para garantizar que ocurría una lisis celular eficiente. A continuación, la placa se leyó en un luminómetro Glomax.

## Resultados

La figura 3f muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células BxPC3. La figura 3g muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células HupT4. La figura 3h muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células HPAFFII. Estos resultados demuestran un incremento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpo y otros anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 (seleccionados del Ejemplo 1).

*Ejemplo 8: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en líneas celulares de leucemia linfocítica crónica.*

## Materiales

Disociador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, EE. UU.

## Método

Las células se disociaron utilizando disociador celular y se realizó un recuento. Se centrifugaron  $5 \times 10^3$  células/pocillo hasta formar un pellet (para las células en suspensión, pueden utilizarse más, dependiendo del tiempo de duplicación de las células, tal como  $10^3$  células/pocillo). El pellet se resuspendió en medio de cultivo hasta una concentración de  $10^5$  células/ml.

Se añadieron 50  $\mu$ l/pocillo de suspensión celular a los pocillos de una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo transparente. Los anticuerpos se diluyeron y titularon a 8 puntos (titulaciones de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0 y 20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Se añadieron anticuerpo diluidos o medios (para las muestras no tratadas) (50  $\mu$ l/pocillo) a los pocillos apropiados. Se añadió exceso de medio (200  $\mu$ l/pocillo) a las filas y columnas exteriores de la placa para prevenir la evaporación. La placa se incubó durante 72 h a 37 °C.

Se sacó la placa del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por otra parte, se descongeló la solución Cell Titer Glo. Se agitó la placa y se lavó 1x con 100  $\mu$ l/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifugó en primer lugar para sedimentar las células). Se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de PBS y 100  $\mu$ l de Cell Titer Glo a cada pocillo y se trituraron para mezclar. La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para garantizar que ocurría una lisis celular eficiente. A continuación, la placa se leyó en un luminómetro Glomax.

## Resultados

La figura 3i muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células EHEB. La figura 3j muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células Mec-1. Estos resultados demuestran un incremento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpo y otros anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 (seleccionados del Ejemplo 1).

*Ejemplo 9: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en líneas celulares de leucemia monocítica aguda.*

## Materiales

Disociador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, EE. UU.

## Método

Las células se disociaron utilizando disociador celular y se realizó un recuento. Se centrifugaron  $5 \times 10^3$  células/pocillo hasta formar un pellet (para las células en suspensión, pueden utilizarse más, dependiendo del tiempo de duplicación de las células, tal como  $10^3$  células/pocillo). El pellet se resuspendió en medio de cultivo hasta una concentración de  $10^5$  células/ml.



Se añadieron 50 µl/pocillo de suspensión celular a los pocillos de una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo transparente. Los anticuerpos se diluyeron y titularon a 8 puntos (titulaciones de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0 y 20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Se añadieron anticuerpo diluidos o medios (para las muestras no tratadas) (50 µl/pocillo) a los pocillos apropiados. Se añadió exceso de medio (200 µl/pocillo) a las filas y columnas exteriores de la placa para prevenir la evaporación. La placa se incubó durante 72 h a 37 °C.

Se sacó la placa del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por otra parte, se descongeló la solución Cell Titer Glo. Se agitó la placa y se lavó 1x con 100 µl/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifugó en primer lugar para sedimentar las células). Se añadieron 100 µl/pocillo de PBS y 100 µl de Cell Titer Glo a cada pocillo y se trituraron para mezclar. La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para garantizar que ocurría una lisis celular eficiente. A continuación, la placa se leyó en un luminómetro Glomax.

## Resultados

La figura 3k muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células AML-193. Estos resultados demuestran un incremento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpo y otros anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 (seleccionados del Ejemplo 1).

*Ejemplo 10: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en líneas celulares de cáncer de mama.*

## Materiales

Disociador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, EE. UU.

## Método

Las células se disociaron utilizando disociador celular y se realizó un recuento. Se centrifugaron  $5 \times 10^3$  células/pocillo hasta formar un pellet (para las células en suspensión, pueden utilizarse más, dependiendo del tiempo de duplicación de las células, tal como  $10^3$  células/pocillo). El pellet se resuspendió en medio de cultivo hasta una concentración de  $10^5$  células/ml.

Se añadieron 50 µl/pocillo de suspensión celular a los pocillos de una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo transparente. Los anticuerpos se diluyeron y titularon a 8 puntos (titulaciones de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0 y 20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Se añadieron anticuerpo diluidos o medios (para las muestras no tratadas) (50 µl/pocillo) a los pocillos apropiados. Se añadió exceso de medio (200 µl/pocillo) a las filas y columnas exteriores de la placa para prevenir la evaporación. La placa se incubó durante 72 h a 37 °C.

Se sacó la placa del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por otra parte, se descongeló la solución Cell Titer Glo. Se agitó la placa y se lavó 1x con 100 µl/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifugó en primer lugar para sedimentar las células). Se añadieron 100 µl/pocillo de PBS y 100 µl de Cell Titer Glo a cada pocillo y se trituraron para mezclar. La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para garantizar que ocurría una lisis celular eficiente. A continuación, la placa se leyó en un luminómetro Glomax.

## Resultados

La figura 3l muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células HCC 70 (negativos para ER, negativos para PR y negativos para Her2). La figura 3m muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células HCC 1806 (negativas para ER, negativas para PR y negativas para Her2). La figura 3n muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células MDA-MB-468. Estos resultados demuestran un incremento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpo.

*Ejemplo 11: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en líneas celulares de cáncer de vejiga.*

## Materiales

Disociador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.

PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, EE. UU.

## Método

Las células se disociaron utilizando disociador celular y se realizó un recuento. Se centrifugaron  $5 \times 10^3$  células/pocillo hasta formar un pellet (para las células en suspensión, pueden utilizarse más, dependiendo del tiempo de duplicación de las células, tal como  $10^3$  células/pocillo). El pellet se resuspendió en medio de cultivo hasta una concentración de  $10^5$  células/ml.

Se añadieron 50 µl/pocillo de suspensión celular a los pocillos de una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo transparente. Los anticuerpos se diluyeron y titularon a 8 puntos (titulaciones de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0 y 20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Se añadieron anticuerpo diluidos o medios (para las muestras no tratadas) (50 µl/pocillo) a los pocillos apropiados. Se añadió exceso de medio (200 µl/pocillo) a las filas y columnas exteriores de la placa para prevenir la evaporación. La placa se incubó durante 72 h a 37 °C.

Se sacó la placa del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por otra parte, se descongeló la solución Cell Titer Glo. Se agitó la placa y se lavó 1x con 100 µl/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifugó en primer lugar para sedimentar las células). Se añadieron 100 µl/pocillo de PBS y 100 µl de Cell Titer Glo a cada pocillo y se trituraron para mezclar. La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para garantizar que ocurría una lisis celular eficiente. A continuación, la placa se leyó en un luminómetro Glomax.

## Resultados

La figura 3o muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células RT4. La figura 3p muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células 5637. La figura 3q muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células SW780. Estos resultados demuestran un incremento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpo.

*Ejemplo 12: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello.*

## Materiales

Disociador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, EE. UU.

## Método

Las células se disociaron utilizando disociador celular y se realizó un recuento. Se centrifugaron  $5 \times 10^3$  células/pocillo hasta formar un pellet (para las células en suspensión, pueden utilizarse más, dependiendo del tiempo de duplicación de las células, tal como  $10^3$  células/pocillo). El pellet se resuspendió en medio de cultivo hasta una concentración de  $10^5$  células/ml.

Se añadieron 50 µl/pocillo de suspensión celular a los pocillos de una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo transparente. Los anticuerpos se diluyeron y titularon a 8 puntos (titulaciones de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0 y 20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Se añadieron anticuerpo diluidos o medios (para las muestras no tratadas) (50 µl/pocillo) a los pocillos apropiados. Se añadió exceso de medio (200 µl/pocillo) a las filas y columnas exteriores de la placa para prevenir la evaporación. La placa se incubó durante 72 h a 37 °C.

Se sacó la placa del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por otra parte, se descongeló la solución Cell Titer Glo. Se agitó la placa y se lavó 1x con 100 µl/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifugó en primer lugar para sedimentar las células). Se añadieron 100 µl/pocillo de PBS y 100 µl de Cell Titer Glo a cada pocillo y se trituraron para mezclar. La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para garantizar que ocurría una lisis celular eficiente. A continuación, la placa se leyó en un luminómetro Glomax.

## Resultados

La figura 3r muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células SCC-9. Estos resultados demuestran un incremento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpo.

*Ejemplo 13: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en líneas celulares de cáncer esofágico.*

#### Materiales

Disociador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, EE. UU.

#### Método

Las células se disociaron utilizando disociador celular y se realizó un recuento. Se centrifugaron  $5 \times 10^3$  células/pocillo hasta formar un pellet (para las células en suspensión, pueden utilizarse más, dependiendo del tiempo de duplicación de las células, tal como  $10^3$  células/pocillo). El pellet se resuspendió en medio de cultivo hasta una concentración de  $10^5$  células/ml.

Se añadieron 50 µl/pocillo de suspensión celular a los pocillos de una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo transparente. Los anticuerpos se diluyeron y titularon a 8 puntos (titulaciones de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0 y 20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Se añadieron anticuerpo diluidos o medios (para las muestras no tratadas) (50 µl/pocillo) a los pocillos apropiados. Se añadió exceso de medio (200 µl/pocillo) a las filas y columnas exteriores de la placa para prevenir la evaporación. La placa se incubó durante 72 h a 37 °C.

Se sacó la placa del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por otra parte, se descongeló la solución Cell Titer Glo. Se agitó la placa y se lavó 1x con 100 µl/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifugó en primer lugar para sedimentar las células). Se añadieron 100 µl/pocillo de PBS y 100 µl de Cell Titer Glo a cada pocillo y se trituraron para mezclar. La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para garantizar que ocurría una lisis celular eficiente. A continuación, la placa se leyó en un luminómetro Glomax.

#### Resultados

La figura 3s muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células OE 19. Estos resultados demuestran un incremento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpo.

*Ejemplo 14: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en líneas celulares de cáncer ovárico.*

#### Materiales

Disociador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, EE. UU.

#### Método

Las células se disociaron utilizando disociador celular y se realizó un recuento. Se centrifugaron  $5 \times 10^3$  células/pocillo hasta formar un pellet (para las células en suspensión, pueden utilizarse más, dependiendo del tiempo de duplicación de las células, tal como  $10^3$  células/pocillo). El pellet se resuspendió en medio de cultivo hasta una concentración de  $10^5$  células/ml.

Se añadieron 50 µl/pocillo de suspensión celular a los pocillos de una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo transparente. Los anticuerpos se diluyeron y titularon a 8 puntos (titulaciones de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0 y 20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Se añadieron anticuerpo diluidos o medios (para las muestras no tratadas) (50 µl/pocillo) a los pocillos apropiados. Se añadió exceso de medio (200 µl/pocillo) a las filas y columnas exteriores de la placa para prevenir la evaporación. La placa se incubó durante 72 h a 37 °C.

Se sacó la placa del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por otra parte, se descongeló la solución Cell Titer Glo. Se agitó la placa y se lavó 1x con 100 µl/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la

placa se centrifugó en primer lugar para sedimentar las células). Se añadieron 100 µl/pocillo de PBS y 100 µl de Cell Titer Glo a cada pocillo y se trituraron para mezclar. La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para garantizar que ocurría una lisis celular eficiente. A continuación, la placa se leyó en un luminómetro Glomax.

## Resultados

La figura 3t muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células OVCAR-3. La figura 3u muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células SK-OV-3. Estos resultados demuestran un incremento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpo.

*Ejemplo 15: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en líneas celulares de mieloma múltiple.*

## Materiales

Disociador celular (disociación celular no enzimática) (MT-25-056CI) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 PBS, pH 7,4 (1X) (SH30028LS) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Medio RPMI 1640 (MT-10-041-CM) de Fisher Scientific, PA, EE. UU.  
 Cell Titer Glo (G7572) de Promega, WI, EE. UU.

## Método

Las células se disociaron utilizando disociador celular y se realizó un recuento. Se centrifugaron  $5 \times 10^3$  células/pocillo hasta formar un pellet (para las células en suspensión, pueden utilizarse más, dependiendo del tiempo de duplicación de las células, tal como  $10^3$  células/pocillo). El pellet se resuspendió en medio de cultivo hasta una concentración de  $10^5$  células/ml.

Se añadieron 50 µl/pocillo de suspensión celular a los pocillos de una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo transparente. Los anticuerpos se diluyeron y titularon a 8 puntos (titulaciones de 3 veces) correspondientes a concentraciones entre 0 y 20 nM (dos veces las concentraciones de ensayo). Se añadieron anticuerpo diluidos o medios (para las muestras no tratadas) (50 µl/pocillo) a los pocillos apropiados. Se añadió exceso de medio (200 µl/pocillo) a las filas y columnas exteriores de la placa para prevenir la evaporación. La placa se incubó durante 72 h a 37 °C.

Se sacó la placa del incubador y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Por otra parte, se descongeló la solución Cell Titer Glo. Se agitó la placa y se lavó 1x con 100 µl/pocillo de PBS (para las células en suspensión, la placa se centrifugó en primer lugar para sedimentar las células). Se añadieron 100 µl/pocillo de PBS y 100 µl de Cell Titer Glo a cada pocillo y se trituraron para mezclar. La placa se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se visualizó mediante microscopía para garantizar que ocurría una lisis celular eficiente. A continuación, la placa se leyó en un luminómetro Glomax.

## Resultados

La figura 3v muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células MOLP-8. La figura 3w muestra la actividad citotóxica de anticuerpos anti-LY75 conjugados con DM1 y DM4 sobre células RPMI8226. Estos resultados demuestran un incremento de la actividad citotóxica proporcional a la concentración de anticuerpo.

*Ejemplo 16: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en modelos de xenoinjerto Raji.*

La eficacia de LY75\_CM1 y LY75\_DM4 se sometió a ensayo en modelo de xenoinjerto subcutáneo de linfoma de Burkitt Raji en ratones SCID.

Se inocularon ratones SCID inmunodeficientes por vía subcutánea con células tumorales Raji (linfoma de Burkitt humano). Se permitió que los tumores se estableciesen y los ratones fueron clasificados en cinco grupos de tratamiento de 3 a 6 ratones por grupo. Cuando el volumen tumoral medio había alcanzado un tamaño medio de 129 a 132 mm<sup>3</sup> por grupo, se trató cada grupo con uno de los compuestos siguientes, administrados por vía intravenosa a las dosis indicadas: grupo 1 (vehículo, solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés)); grupo 2 (LY75\_CM1, 10 mg/kg), grupo 3 (control de isotipo-DM1, 10 mg/kg), grupo 4 (LY75\_DM4, 5 mg/kg), grupo 5 (control de isotipo-SPBDDM4, 5 mg/kg). Se administró una segunda dosis una semana después. Se realizó un seguimiento de los pesos corporales (PC); los ratones fueron examinados frecuentemente para su estado de salud y efectos secundarios adversos, y se midieron los tumores dos veces a la semana. Los ratones fueron eutinizados cuando sus tumores habían alcanzado el criterio de valoración de volumen tumoral de 2.000 mm<sup>3</sup> o tras 60 días, lo que ocurriese

primero. Se determinó la eficacia a partir del retardo en el crecimiento tumoral (RCT), el incremento en la mediana de tiempo hasta el criterio de valoración (THV) y a partir del análisis de rangos logarítmicos de las diferencias en curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en ratones tratados con CAF frente a tratados con PBS. Los cinco primeros ratones de control tratados con vehículo en alcanzar el criterio de valoración fueron muestreados para tumores, los cuales fueron procesados mediante fijación con formalina e inclusión en parafina.

## Resultados

La figura 4a muestra que cada uno de LY75\_DM1 y LY75\_DM4 mostró actividad antitumoral significativa y extendió significativamente la supervivencia en el modelo de xenoinjerto subcutáneo de linfoma de Burkitt Raji en ratones SCID en comparación con controles; sin embargo, las dosis de LY75\_DM4 de 5 mg/kg resultaron significativamente más eficaces que las dosis de 10 mg/kg de LY75\_DM1, resultando en 5 de 6 ratones con regresión tumoral total aunque transitoria. Todos los tratamientos resultaron bien tolerados y no se observaron signos clínicos de toxicidad. Estos datos sugieren el potencial de los CAF con diana en LY75, por ejemplo LY75\_DM1 y LY75\_DM4, de proporcionar un beneficio clínico en el tratamiento de los pacientes de cáncer de linfoma no Hodgkin humano.

*Ejemplo 17: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en modelos de xenoinjerto Namalwa.*

Se sometió a ensayo la eficacia de LY75\_DM1 y LY75\_DM4 en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de linfoma de Burkitt Namalwa en ratones SCID.

Se inocularon células tumorales Namalway (linfoma de Burkitt humano) en ratones SCID inmunodeficientes. Se permitió que se estableciesen los tumores y los ratones fueron clasificados en cinco grupos de tratamiento de 6 ratones cada uno. Cuando el volumen tumoral medio había alcanzado un nivel medio de 114 mm<sup>3</sup> por grupo, se trató cada grupo con uno de los compuestos siguientes, administrado por vía intravenosa a las dosis indicadas: grupo 1 (vehículo; solución salina tamponada con fosfato (PBS)); grupo 2 (LY75\_DM1, 10 mg/kg), grupo 3 (control de isotipo-DM1, 10 mg/kg); grupo 4 (LY75\_DM4, 5 mg/kg); grupo 5 (control de isotipo-SPBDDM4, 5 mg/kg). Se realizó un seguimiento de los pesos corporales (PC); los ratones fueron examinados frecuentemente para su estado de salud y efectos secundarios adversos, y se midieron los tumores dos veces a la semana. Los ratones fueron eutanizados cuando sus tumores habían alcanzado el criterio de valoración de volumen tumoral de 2.000 mm<sup>3</sup> o tras 60 días, lo que ocurriese primero. Se determinó la eficacia a partir del retardo en el crecimiento tumoral (RCT), el incremento en la mediana de tiempo hasta el criterio de valoración (THV) y a partir del análisis de rangos logarítmicos de las diferencias en curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en ratones tratados con CAF frente a tratados con PBS. Los cinco primeros ratones de control tratados con vehículo en alcanzar el criterio de valoración fueron muestreados para tumores, los cuales fueron procesados mediante fijación con formalina e inclusión en parafina.

## Resultados

La figura 4b muestra que cada uno de LY75\_DM1 y LY75\_DM4 mostró actividad antitumoral significativa y extendió significativamente la supervivencia en el modelo de xenoinjerto subcutáneo de linfoma de Burkitt Namalwa en ratones SCID en comparación con controles; sin embargo, las dosis de LY75\_DM4 de 5 mg/kg resultaron significativamente más eficaces que las dosis de 10 mg/kg de LY75\_DM1, causando una breve reducción del volumen tumoral. Todos los tratamientos resultaron bien tolerados y no se observaron signos clínicos de toxicidad. Estos datos sugieren el potencial de los CAF con diana en LY75, por ejemplo LY75\_DM1 y LY75\_DM4, de proporcionar un beneficio clínico en el tratamiento de los pacientes de cáncer de linfoma no Hodgkin humano.

*Ejemplo 18: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en modelos de xenoinjerto de cáncer pancreático.*

Se sometió a ensayo la eficacia de LY75\_DM1 y LY75\_DM4 en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de adenocarcinoma pancreático HPAFII en ratones desnudos atímicos.

Se inocularon células tumorales HPAFII (adenocarcinoma pancreático humano) en ratones desnudos atímicos inmunodeficientes. Se permitió que se estableciesen los tumores y los ratones fueron clasificados en cinco grupos de tratamiento de 6 ratones cada uno. Cuando el volumen tumoral medio había alcanzado un nivel medio de ~114 mm<sup>3</sup> por grupo, se trató cada grupo con uno de los compuestos siguientes, administrado por vía intravenosa a las dosis indicadas: grupo 1 (vehículo; solución salina tamponada con fosfato (PBS)); grupo 2 (LY75\_DM1, 10 mg/kg), grupo 3 (control de isotipo-DM1, 10 mg/kg); grupo 4 (LY75\_DM4, 5 mg/kg); grupo 5 (control de isotipo-SPBDDM4, 5 mg/kg). Se realizó un seguimiento de los pesos corporales (PC); los ratones fueron examinados frecuentemente para su estado de salud y efectos secundarios adversos, y se midieron los tumores tres veces a la semana. Los ratones fueron eutanizados cuando sus tumores habían alcanzado el criterio de valoración de volumen tumoral de 2.000 mm<sup>3</sup> o tras 90 días, lo que ocurriese primero. Se determinó la eficacia a partir del efecto del tratamiento sobre el volumen tumoral y a partir del análisis de rangos logarítmicos de las diferencias en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en ratones tratados con CAF o tratados con PBS. Los tumores se muestrearon de ratones de control tratados con vehículo y se procesaron mediante fijación con formalina e inclusión en parafina.

## Resultados

La figura 4c muestra que LY75\_DM1 y LY75\_DM4 mostraban una actividad antitumoral y de extensión de la supervivencia significativas y similarmente potentes en el modelo de xenoinjerto de HPAFII en ratones desnudos en comparación con los controles. Todos los tratamientos resultaron bien tolerados y no se observaron signos clínicos de toxicidad. Estos datos sugieren el potencial de los CAF con diana en LY75, por ejemplo LY75\_DM1 y LY75\_DM4, de proporcionar beneficio clínico en el tratamiento de pacientes de cáncer pancreático humano.

*Ejemplo 19: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en modelos de xenoinjerto de cáncer de vejiga.*

Se sometió a ensayo la eficacia de LY75\_DM1 y LY75\_DM4 en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de carcinoma de vejiga humano SW780 en ratones SCID.

Se inocularon células tumorales HPAFII (adenocarcinoma pancreático humano) en ratones desnudos atímicos inmunodeficientes. Se permitió que se estableciesen los tumores y los ratones fueron clasificados en cinco grupos de tratamiento de 6 ratones cada uno. Cuando el volumen tumoral medio había alcanzado un nivel medio de  $\sim 114 \text{ mm}^3$  por grupo, se trató cada grupo con uno de los compuestos siguientes, administrado por vía intravenosa a las dosis indicadas: grupo 1 (vehículo; solución salina tamponada con fosfato (PBS)); grupo 2 (LY75\_DM1, 10 mg/kg), grupo 3 (LY75\_DM1, 2,5 mg/kg); grupo 4 (LY75\_DM1, 5 mg/kg); grupo 5 (LY75\_DM4, 1 mg/kg); grupo 6 (LY75\_DM4, 2,5 mg/kg); grupo 7 (LY75\_DM4, 5 mg/kg), grupo 8 (control de isotipo-SPBDDM4, 5 mg/kg). Se realizó un seguimiento de los pesos corporales (PC); los ratones fueron examinados frecuentemente para su estado de salud y efectos secundarios adversos, y se midieron los tumores tres veces a la semana. Los ratones fueron eutanizados cuando sus tumores habían alcanzado el criterio de valoración de volumen tumoral de  $2.000 \text{ mm}^3$  o tras 90 días, lo que ocurriese primero. Se determinó la eficacia a partir del efecto del tratamiento sobre el volumen tumoral y a partir del análisis de rangos logarítmicos de las diferencias en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en ratones tratados con CAF o tratados con PBS. Los tumores se muestrearon de ratones de control tratados con vehículo y se procesaron mediante fijación con formalina e inclusión en parafina.

## Resultados

La figura 4d muestra que LY75\_DM1 y LY75\_DM4 mostraban una actividad antitumoral y de extensión de la supervivencia significativas y similarmente potentes en el modelo de xenoinjerto de SW780 en ratones desnudos en comparación con los controles. Todos los tratamientos resultaron bien tolerados y no se observaron signos clínicos de toxicidad. Estos datos sugieren el potencial de los CAF con diana en LY75, por ejemplo LY75\_DM1 y LY75\_DM4, de proporcionar beneficio clínico en el tratamiento de pacientes de cáncer de vejiga humano.

*Ejemplo 20: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en modelos de xenoinjerto de cáncer de mama.*

Se sometió a ensayo la eficacia de LY75\_DM1 y LY75\_DM4 en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de MDA-MB-468 en ratones desnudos atímicos.

Se inocularon células tumorales MDA-MB-468 (adenocarcinoma de mama triple negativo humano) en ratones desnudos atímicos inmunodeficientes. Se permitió que se estableciesen los tumores y los ratones fueron clasificados en cinco grupos de tratamiento de 10 ratones cada uno. Cuando el volumen tumoral medio había alcanzado un nivel medio de  $167 \text{ mm}^3$  por grupo, se trató cada grupo con uno de los compuestos siguientes, administrado por vía intravenosa a las dosis indicadas: grupo 1 (vehículo; succinato sódico 20 mM, pH 5,0; trehalosa al 6 %, polisorbato al 0,04 %); grupo 2 (LY75\_DM1, 5 mg/kg), grupo 3 (LY75\_DM1, 10 mg/kg); grupo 4 (LY75\_DM4, 5 mg/kg); grupo 5 (LY75\_DM4, 2,5 mg/kg); grupo 6 (LY75\_DM4, 1 mg/kg), grupo 7 (control de isotipo-DM4, 5 mg/kg). Se realizó un seguimiento de los pesos corporales (PC); los ratones fueron examinados frecuentemente para su estado de salud y efectos secundarios adversos, y se midieron los tumores dos veces a la semana. Los ratones fueron eutanizados 82 días después de la inoculación tumoral. Se determinó la eficacia a partir de la actividad antitumoral (tamaño tumoral medio en el grupo de tratamiento/tamaño tumoral medio en el grupo de control)  $\times 100$  y el incremento en el tiempo medio hasta el criterio de valoración (THV) en ratones tratados con CAF o tratados con PBS. Los cinco tumores más grandes se muestrearon de ratones de control tratados con vehículo el día 72 después de la inoculación y se procesaron mediante fijación con formalina e inclusión en parafina.

## Resultados

La figura 4e muestra que cada uno de LY75\_DM1 y LY75\_DM4 demostró una drástica actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto de MDA-MB-468 en ratones desnudos en comparación con los controles. Se observó actividad dependiente de la dosis con LY75\_DM4, en donde 2,5 y 5 mg/kg fueron mucho más potentes que 1 mg/kg. A la dosis de 5 mg/kg, LY75\_DM1 y LY75\_DM4 resultaron similarmente eficaces. Se observaron regresiones sostenidas de volumen tumoral medio para LY75\_DM1 a 10 y 5 mg/kg y LY75\_DM4 a 5 y 2,5 mg/kg. Todos los tratamientos

resultaron bien tolerados y no se observaron signos clínicos de toxicidad. Estos datos sugieren el potencial de los CAF con diana en LY75, por ejemplo LY75\_DM1 y LY75\_DM4, de proporcionar beneficio clínico en el tratamiento de pacientes de cáncer de mama triple negativo humano.

*Ejemplo 21: eficacia de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en modelos de xenoinjerto de cáncer colorrectal.*

Se sometió a ensayo la eficacia de LY75\_DM1 y LY75\_DM4 en un modelo de xenoinjerto subcutáneo de adenocarcinoma colorrectal COLO205 en ratones desnudos atímicos.

Se inocularon por vía subcutánea células tumorales COLO205 (adenocarcinoma colorrectal humano) en ratones desnudos atímicos inmunodeficientes. Se permitió que se estableciesen los tumores y los ratones fueron clasificados en cinco grupos de tratamiento de 6 ratones cada uno. Cuando el volumen tumoral medio había alcanzado un nivel medio de 117 mm<sup>3</sup> por grupo, se trató cada grupo con uno de los compuestos siguientes, administrado por vía intravenosa a las dosis indicadas: grupo 1 (vehículo; solución salina tamponada con fosfato (PBS)); grupo 2 (LY75\_DM1, 10 mg/kg), grupo 3 (control de isotipo-DM1, 10 mg/kg); grupo 4 (LY75\_DM4, 5 mg/kg); grupo 5 (control de isotipo-DM4, 5 mg/kg). Se administró una segunda dosis doce días después de la primera. Se realizó un seguimiento de los pesos corporales (PC); los ratones fueron examinados frecuentemente para su estado de salud y efectos secundarios adversos, y se midieron los tumores dos veces a la semana. Los ratones fueron eutanizados cuando sus tumores alcanzaron el volumen tumoral del criterio de valoración, de 1.000 mm<sup>3</sup> o tras 60 días, lo que ocurriese en primer lugar. Se determinó la eficacia a partir del retraso en el crecimiento tumoral (RCT), el incremento de la mediana del tiempo hasta el criterio de valoración (THV) y a partir del análisis de rangos logarítmicos de las diferencias en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier en ratones tratados con CAF o tratados con PBS. Los primeros cinco ratones de control tratados con vehículo en alcanzar el criterio de valoración fueron muestreados para tumores que se procesaron mediante fijación con formalina e inclusión en parafina.

#### Resultados

La figura 4f muestra que LY75\_DM1 y LY75\_DM4 mostró una actividad antitumoral y una extensión de la supervivencia modestas similares en el modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma colorrectal COLO205 en ratones desnudos en comparación con los controles. Todos los tratamientos resultaron bien tolerados y no se observaron signos clínicos de toxicidad. Estos datos sugieren el potencial de los CAF con diana en LY75, por ejemplo LY75\_DM1 y LY75\_DM4, de proporcionar beneficio clínico en el tratamiento de pacientes de cáncer colorrectal humano.

*Ejemplo 22: toxicidad de anticuerpos monoclonales anti-LY75 conjugados con DM1 y conjugados con DM4 en monos Cynomolgus.*

Seis monos macho fueron asignados al estudio, 2 monos/grupo. Se administró vehículo (PBS), LY75\_DM4 (cortable) o LY75\_DM1 (no cortable) dos veces (el día 1 y el día 29) mediante una infusión intravenosa de 15 minutos a razón de 0 mg/kg/dosis (PBS, vehículo), 5 mg/kg/dosis (LY75\_DM4, cortable) o 10 mg/kg/dosis (LY75\_DM1, no cortable). Se recogieron muestras de sangre para evaluaciones toxicocinéticas previamente al inicio de las dosis (día 1) y 1, 2, 3, 7, 14, 21 y 28 días después de cada dosis. Se recogieron muestras de sangre para los análisis de patología clínica previamente al inicio de las dosis (día 1), y 1, 3, 7, 14, 21 y 28 días después de cada dosis (28 días después de la primera dosis sirvió como punto temporal predosis para la segunda dosis). Todos los animales del estudio fueron eutanizados y necropsiados después de la extracción final de sangre el día 57. Se aisló el plasma separado de cada extracción de sangre, se congeló y se envió a Oxford BioTherapeutics, Inc. para el análisis para la concentración de CAF mediante ELISA.

Los resultados de patología clínica relacionados con el tratamiento incluyeron una leve anemia regenerativa y reducciones transitorias en el perfil de leucocitos en sangre, especialmente en los recuentos de neutrófilos. Se observó anemia tanto en animales tratados con 5 mg/kg de LY75\_DM4 como en uno de los dos animales tratados con 10 mg/kg de LY75\_DM1. Se observó en todos los animales neutropenia grave con un mínimo una semana después de la dosis y una rápida recuperación de los recuentos; el punto más bajo en el recuento absoluto de neutrófilos fue más bajo en los animales tratados con LY75\_DM4. No se produjeron efectos relacionados con el artículo de ensayo en los parámetros de coagulación APTT y PT. Los cambios de química sérica incluyeron incrementos transitorios en AST, CK, LDH (en 1 de 2 animales en cada grupo de tratamiento) y globulina tras la administración de 5 mg/kg de LY75\_DM4 y 10 mg/kg de LY75\_DM1. Además, se observó un incremento transitorio en el enzima específicamente hepático ALT solo en los animales tratados con LY75\_DM4. La corta duración y/o la magnitud de los incrementos en los parámetros de química sérica sugieren que no fueron adversos. No se obtuvieron hallazgos relacionados con el artículo de ensayo en los análisis de orina. Tras el examen en la necropsia tras una periodo de recuperación de cuatro semanas, no hubo hallazgos de patología macroscópica o cambios en pesos absolutos y relativos de órganos relacionados con el tratamiento. Solo hubo hallazgos histopatológicos en la glándula tiroidea (una alteración de la morfología del coloide en los folículos) y riñones (túbulos dilatados en el córtex externo), que se clasificaron como de gravedad mínima; no estaban asociados a cambios en otros parámetros de estudio, no se consideraron adversos y fueron de mínima significación toxicológica. Conclusión: el tratamiento con dosis repetidas con dos dosis de 5 mg/kg de LY75\_DM4 o

10 mg/kg de LY75\_DM1 resultó bien tolerado en monos Cynomolgus. Todos los hallazgos de toxicidad relacionados con el tratamiento fueron reversibles tras un periodo de recuperación de cuatro semanas.

*Ejemplo 23: caracterización de epítomos de LY75\_A1 mediante análisis de unión por separación celular activada por fluorescencia (FACS) competitiva.*

#### Método

Se desprendieron células COLO205 (ATCC, n.º de catálogo CCL-222) de matraces de cultivo de tejidos con disociador celular (Cellgro, n.º de catálogo MT-25-056CI). Las células se lavaron y se resuspendieron en tampón de FACS (PBS + FBS al 2 %), se neutralizaron con medio de cultivo y se realizó un recuento. Las células se sembraron a razón de 50.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo en V. Las células se lavaron una vez con tampón de FACS (PBS (Fisher, n.º de catálogo SH30028-03) + FBS al 2 %). Se añadió un mAb anti-LY75 (seleccionado del Ejemplo 1) o LY75\_A1 a los pocillos partiendo de 250 nM y se diluyó en serie 3 veces y aplicó a los pocillos relevantes durante 45 minutos sobre hielo. Los pocillos de ensayo que requirieron etapas de tinción individuales o múltiples se dejaron en tampón de FACS según resultase apropiado para garantizar que se había completado la tinción final simultáneamente para todas las condiciones sometidas a ensayo. Se dejaron dos pocillos sin teñir en tampón de FACS como controles.

Después de la incubación con anticuerpo de bloqueo, las células se lavaron dos veces en tampón de FACS. Las células se resuspendieron en tampón de FACS que contenía el mAb anti-LY75 conjugado con MCC-DM1 (1 nM) y se incubaron sobre hielo durante 45 minutos. Las células se lavaron tal como anteriormente y se resuspendieron en tampón de FACS más 1 µg/ml de anticuerpo de ratón antimaitansina y se incubaron en hielo durante 45 minutos. Las células se lavaron tal como anteriormente y se resuspendieron en tampón de FACS que contenía 2 µg/ml de anticuerpo de cabra antikappa de ratón-RPE. Las células se incubaron sobre hielo durante 45 minutos y después se lavaron tal como anteriormente. Las células se resuspendieron en tampón de FACS a razón de 200 µl por pocillo. Se determinó la intensidad de fluorescencia media de cada muestra utilizando un citómetro de flujo Guava EasyCyte Plus HT (formatos de placa de 96 pocillos) y se analizaron los datos en bruto utilizando el Guava Cytosoft.

#### Resultados

La figura 5a muestra que el bloqueo con el mAb anti-LY75-MCC-DM1 redujo la unión del mAb anti-LY75. El análisis de la unión de LY75\_A1 a las células COLO205 mostró que LY75\_A1 es incapaz de bloquear la unión de mAb anti-LY75-MCC-DM1 (ver la figura 5b). Por lo tanto, puede determinarse que el mAb anti-LY75 y LY75\_A1 son anticuerpos no competitivos y que LY75\_A1 reconoce un epítipo diferente y único de LY75 respecto al de los demás anticuerpos anti-LY75.

*Ejemplo 24: caracterización de epítomos de LY75\_A1 mediante ensayo de micromatriz de péptidos.*

#### Método

El análisis de micromatriz de péptidos fue realizado por LC Sciences, Houston, TX; en resumen, el método comprendió las etapas siguientes: se sintetizaron péptidos 8-meros contiguos de la proteína LY75 que presentaban un solapamiento de un aminoácido en los residuos comprendidos entre 216 y 1666 de la proteína LY75 de longitud completa y se inmovilizaron en un chip de micromatriz. El chip comprendía tres paneles, de manera que el experimento se llevó a cabo por triplicado. La micromatriz se trató con LY75\_A1 para identificar los péptidos a los que se unía el anticuerpo. El ensayo de unión se llevó a cabo bajo las condiciones siguientes:

La micromatriz que comprendía los péptidos contiguos por triplicado se lavó con 1 ml de tampón de unión a 4 °C durante 20 min. A continuación, se incubó con 1 µg/ml de LY75\_A1 en tampón de unión (pH 7,0) a 4 °C durante 2 horas. La matriz se lavó nuevamente con 0,5 ml de tampón de lavado a 4 °C durante 30 min y después se incubó con 25 ng/ml de conjugado de anti-IgG humana-Alexa 647 en tampón de unión (pH 7,0) a 4 °C durante 1 hora. La matriz se lavó nuevamente con 0,5 ml de tampón de lavado a 4 °C durante 30 min.

A continuación, la matriz se escaneó a 635 nm y PMT 500 y se registró la intensidad de la señal. Se clasificó el péptido como detectable si estaba presente en por lo menos 2/3 duplicados legales. La intensidad media de señal de las réplicas se informó como la intensidad de señal final.

#### Resultados

Tal como puede observarse en la figura 6, el anticuerpo LY75\_A1 mostró unión específica a varios péptidos localizados en la matriz. La señal máxima observada para la unión de LY75\_A1 era 25000 (escala 1 a 65535), en donde la señal media para todas las manchas en la matriz era aproximadamente 885. Se fijó una intensidad de señal de 3000 como el punto de corte de fondo para unión no específica. Basándose en el nivel de la intensidad de señal de unión a anticuerpo observada, se identificaron secuencias que potencialmente formaban el epítipo de LY75\_A1. Se muestran estas regiones en las figuras 6a a 6j y como las SEQ ID NO: 22 a 31.



*Ejemplo 25: ensayo de captura de péptidos LY75\_A1.*

## Método

## 1.1 Ensayo de captura.

Se digirió proteína LY75 recombinante mediante proteólisis trípica sobre perlas (Promega, EE. UU.) Los péptidos digeridos resultantes se recuperaron utilizando una columna de captura C18 (Thermo Fisher Scientific). A continuación, los péptidos purificados se incubaron con 200 µl de perlas con proteína A entrecruzadas con anticuerpo LY75A1, durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, se recogieron los péptidos no unidos y las perlas se lavaron con 1 ml de PBS dos veces. Los péptidos unidos a anticuerpos se eluyeron de las perlas mediante calentamiento de las mismas a 90 °C en 100 µl de PBS durante 5 minutos. Se repitió esta etapa de elución.

## 1.2 Espectrometría de masas.

Las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas utilizando un sistema de UPLC Water nanoACQUITY dotado de una columna C18 nanoACQUITY UPLC BEH 130, de 75 µm x 250 mm (186003545) y un LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific). Los péptidos se eluyeron con un gradiente de 300 nL/min creciente de acetonitrilo al 3 % hasta acetonitrilo al 35 % a lo largo de 120 min. Los espectros de masas de escaneo completo se adquirieron a 60000 de poder de resolución en el intervalo de masas de 400 a 2000 m/z en el Orbitrap. En cada ciclo, se seleccionaron los veinte péptidos más intensos para los escaneos de CID MS/MS en la trampa de iones lineal con fuente de ionización por nanopulverización integrada en el instrumento.

## 1.3 Análisis de secuencias de aminoácidos de los péptidos.

Los datos en bruto generados en el LTQ Orbitrap Velos se procesaron mediante el software Mascot (Matrix Science), que utiliza el algoritmo Mowse (Curr. Biol. 1993 Jun 1;3(6):327-3) para inferir las secuencias de aminoácidos a partir de las listas de picos mediante búsqueda en una base de datos de secuencias que consistía en Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), IPI ([www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html](http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html)) y SwissProt (<http://www.uniprot.org>) junto con secuencias de proteína contaminantes. Entre los criterios para la identificación de péptidos se incluyeron la digestión con tripsina, hasta 2 sitios de corte faltantes y diversas modificaciones biológicas y químicas (metionina oxidada, modificación de cisteína con MMTS o yodoacetamida y fosforilación de serina, treonina y tirosina). Los péptidos con clasificación de 1 con un valor esperado de 0,05 % o inferior, una puntuación iónica de 28 o superior fueron cargados en la base de datos OGAP.

## 1.4 Discriminación de péptidos asociados a LY75.

El procedimiento para identificar LY75 utilizó las secuencias de péptidos obtenidas experimentalmente mediante espectrometría de masas, tal como se ha descrito anteriormente, de proteínas humanas naturales con el fin de identificar y organizar los exones codificantes en la secuencia publicada del genoma humano. Estas secuencias determinadas experimentalmente se compararon con la base de datos OGAP®, que ha sido compilado mediante procesamiento e integración de masas de péptidos, firmas peptídicas, EST y datos de secuencias genómicas de dominio público, tal como se describe en la solicitud de patente internacional n.º WO2009/087462.

## Resultados

Los resultados del ensayo de captura de péptidos utilizando el anticuerpo LY75\_A1 se muestran en la Tabla 1, a continuación, y en la figura 7. Los péptidos que fueron identificados en ambas eluciones de péptidos 1a y 1b en el ensayo de captura y en el ensayo de micromatriz se consideró que eran los candidatos más probables para formar el epítopo.

Tabla 1: comparación de micromatriz de péptidos y experimentos de captura de péptidos

| SEQ ID NO: | Péptido identificado mediante ensayo de micromatriz | Péptido identificado mediante ensayo de captura |
|------------|---|---|
|            | Región 1 (aa609-618)                                | -   |
|            | Región 2 (aa651-662)                                | -   |
| 46         | Región 3 (aa761-780)                                | GWHFYDDR (765-772)                              |
| 47         | Región 4 (aa883-901)                                | ISEWPIDDHFTYSR (877-890)                        |
| 48         |   | FPVTFGEECLYMSAK (896-910)                       |
| 49         | Región 5 (aa1029-1040)                              | ELTYSNFHPLLVSGR (1030-1044)                     |
| 50         | Región 6 (aa1077-1093)                              | HFVSLCQK (1084-1091)                            |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Péptido identificado mediante ensayo de micromatriz | Péptido identificado mediante ensayo de captura |
|------------|---|---|
| 51         | Región 7 (aa1107-1118)                              | QTLQNASETVK (1099-1109)                         |
|            | Región 8 (aa1368-1378)                              | -   |
|            | Región 9 (aa1518-1528)                              | -   |
|            | Región 10 (aa1535-1554)                             | -   |

La Tabla 1 muestra la identificación de varias regiones peptídicas de LY75 solapantes tanto en el ensayo de micromatriz de péptidos como en ambas eluciones, 1 a y 1b, en el ensayo de captura de péptidos. Se considera que estas regiones son las que más probablemente contienen el epítipo reconocido por el anticuerpo LY75\_A1, ya que ligaron LY75\_A1, analizado mediante ambas técnicas utilizadas.

#### Ejemplo 26

Varias líneas celulares de linfoma de células B grandes difusas de células B activadas (LCBGD-CBA) (es decir, las líneas celulares TMD8 y HBL1) fueron expuestas durante 72 horas a dosis crecientes de LY75\_DM4 (es decir, 0,018 – 0,037 – 0,075 – 0,15 – 0,3 – 0,6 – 1,2 nM) ya sea solas o en combinación con dosis crecientes de rituximab (2,34 – 4,68 – 9,37 – 18,75 – 37,5 – 75 – 150) o ibrutinib (15,6 – 31,2 – 62,5 – 125 – 250 – 500 – 1000 nM). A lo anterior siguió un ensayo de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio].

Se estimó el índice de combinación (IC) de Chou-Talalay utilizando el paquete Synergy R (Preclinical versus Clinical Drugs Combination Studies. Chou TC. Leuk. Lymphoma 2008;49(11):2059-2080). Lo anterior proporciona una definición cuantitativa de sinergia fuerte (<0,3), sinergia (0,3 a 0,9), efecto aditivo (0,9 a 1,1) o antagonismo/ausencia de beneficio (>1,1).

La figura 8 muestra los efectos sinérgicos observados entre LY75\_DM4 e ibrutinib. Se muestran datos complementarios en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2: índice de combinación (IC) de Chou-Talalay de diferentes dosis de LY75\_DM4 en combinación con ibrutinib en tres líneas celulares HBL-1 LCBGD-CBA

| n.º | Ibrutinib (nM) | LY75_DM4 (nM) | IC    |
|-----|----------------|---------------|-------|
| 1   | 1,5625         | 0,01875       | 0,481 |
| 2   | 1,5625         | 0,0375        | 0,627 |
| 3   | 1,5625         | 0,075         | 0,862 |
| 4   | 1,5625         | 0,15          | 0,360 |
| 5   | 1,5625         | 0,3           | 0,287 |
| 6   | 1,5625         | 0,6           | 0,270 |
| 7   | 1,5625         | 1,2           | 0,343 |
| 8   | 3,125          | 0,01875       | 0,411 |
| 9   | 3,125          | 0,0375        | 0,358 |
| 10  | 3,125          | 0,075         | 0,461 |
| 11  | 3,125          | 0,15          | 0,287 |
| 12  | 3,125          | 0,3           | 0,251 |
| 13  | 3,125          | 0,6           | 0,246 |
| 14  | 3,125          | 1,2           | 0,394 |
| 15  | 6,25           | 0,01875       | 0,204 |
| 16  | 6,25           | 0,0375        | 0,219 |
| 17  | 6,25           | 0,075         | 0,275 |
| 18  | 6,25           | 0,15          | 0,226 |
| 19  | 6,25           | 0,3           | 0,216 |
| 20  | 6,25           | 0,6           | 0,222 |
| 21  | 6,25           | 1,2           | 0,343 |
| 22  | 12,5           | 0,01875       | 0,205 |
| 23  | 12,5           | 0,0375        | 0,152 |
| 24  | 12,5           | 0,075         | 0,287 |
| 25  | 12,5           | 0,15          | 0,217 |
| 26  | 12,5           | 0,3           | 0,228 |
| 27  | 12,5           | 0,6           | 0,222 |
| 28  | 12,5           | 1,2           | 0,343 |
| 29  | 25             | 0,01875       | 0,152 |
| 30  | 25             | 0,0375        | 0,183 |

(continuación)

| n.º | Ibrutinib (nM) | LY75_DM4 (nM) | IC    |
|-----|----------------|---------------|-------|
| 31  | 25             | 0,075         | 0,202 |
| 32  | 25             | 0,15          | 0,199 |
| 33  | 25             | 0,3           | 0,193 |
| 34  | 25             | 0,6           | 0,222 |
| 35  | 25             | 1,2           | 0,343 |
| 36  | 50             | 0,01875       | 0,374 |
| 37  | 50             | 0,0375        | 0,473 |
| 38  | 50             | 0,075         | 0,287 |
| 39  | 50             | 0,15          | 0,192 |
| 40  | 50             | 0,3           | 0,194 |
| 41  | 50             | 0,6           | 0,246 |
| 42  | 50             | 1,2           | 0,394 |
| 43  | 100            | 0,01875       | 0,715 |
| 44  | 100            | 0,0375        | 0,748 |
| 45  | 100            | 0,075         | 0,457 |
| 46  | 100            | 0,15          | 0,187 |
| 47  | 100            | 0,3           | 0,195 |
| 48  | 100            | 0,6           | 0,222 |
| 49  | 100            | 1,2           | 0,394 |

SECUENCIAS:

5

| SEQ ID<br>n.º | Descripción         | Secuencia  |
|---------------|---------------------|--|
| 1             | A1_VH aa            | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYSNAWMSWVRQAPG<br>KGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVQGRFTISRDDSKNTLYLQMN<br>SLKTEDTAVYYCTIFGVVSFDYWGQGTLLTVSS  |
| 2             | A1_VL aa            | DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDYLSWYQQRPGKAP<br>NLLIYAASNLKTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISTLQPEDFATYYCQ<br>QSYRSPWTFGQGTKVEIKR   |
| 3             | A1_VH nt            | gaggtgcagctggaggagctgggggaggctggtaaagccgggggggctccttagactct<br>cctgtgcagcctctggcttcacttacagtaacgcctggatgagctgggtccgccaggctcca<br>gggaaggggctggagtggtggccgtattaaaagcaaaactgatgggtgggacaacaga<br>ctacgtgcacccgtgcaaggcagatcaccatctcaagagatgattcaaaaaacacgtg<br>tatctgcaaatgaacagcctgaaaaccgaggacacagccgtgtattactgtacgattttgga<br>gtggttagctttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctca |
| 4             | A1_VL nt            | gacgtccagatgacccagctcctcctcctctgtctgcatctgttgagacagagtcaccatc<br>actlgccgggcaagtcagagcatlagcgactatttaagtggatcagcagagaccaggga<br>aagcccctaacctcctgatctatgtcgcacccaatttaagactgggggccatcaagggtca<br>gtggcagtggaatctgggacagatttcactctcaccatcagcactctgcaacctgaagatttg<br>caacgtactactgtcaacagagttacagggtcccggtggacgttcggccaagggaaccaagg<br>tggaatcaaacga                                |
| 5             | A1_VH_CDR<br>1 aa   | NAWMS  |
| 6             | A1_VH_CDR<br>2 aa   | RIKSKTDGGTTDYAAPVQG  |
| 7             | A1_VH_CDR<br>3 aa   | FGVVSFDY   |
| 8             | A1_VL_CDR1<br>aa    | RASQSIDYLS   |
| 9             | A1_VL_CDR2<br>aa    | AASNLKT  |
| 10            | A1_VL_CDR3<br>aa    | QSYRSPWT   |
| 11            | VH3 3-<br>15/D4 411 | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPG<br>KGLEWVGRIKSKTDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN<br>SLKTEDTAVYYCTTTT   |

(continuación)

|    |                |  |
|----|----------------|--|
| 12 | JH4            | YFDYWGQGTLVTVSS  |
| 13 | O12            | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP<br>KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ<br>QSYS  |
| 14 | JK1            | WTFGQGGTKVEIKR   |
| 15 | LY75 (DEC-205) | MRTGWATPRRPAGLLMLLFWFFDLAEPSTGRAANDPFTIVHGNT<br>GKCIKPVYGWIVADDCDEDEDKLWKWWSQHRLFHLHSQKCLGL<br>DITKSVNELRMFSCDSSAMLWWKCEHHSYGAARYRLALKDGH<br>GTAISNASDVWKKGGSEESLCDQPYHEIYTRDGNISYGRPCFPF<br>LIDGTWHHDCILDEDHSGPWCATTLNIEYDRKWGICLKPENGCE<br>DNWEKNEQFGSCYQFNTQTALSWKEAYVSCQNQGADLLSINSA<br>AELTYLKEKEGIAKIFWIGLNQLYSARGWEWSHDKPLNFLNWD<br>DRPSAPTIGGSSCARMDAESGLWQSFSCAQLPYVCRKPLNNT<br>VELTDVWTYS DTRCDAGWLPNNGFCYLLVNESNSWDKAHAKCK<br>AFSSDLISIHSLADVEVVVTKLHNEDIKEEVWIGLKNINIPTLFQWS<br>DGTEVTLTYWDENEPNVPYNKTPNCVSYLGELGQWKVQSCEEK<br>LKYVCKRKGEKLNDASSDKMCPPEDEGWKRHGETCYKIYEDEVP<br>FGTNCNLTITSRFEQEYLNDLMKKYDKSLRKYFWTGLRDVDSCG<br>EYNWATVGGRRRAVTFSSNWNFLPASPGGCAMSTGKSVGKW<br>EVKDCRSFKALSICKKMSGPLGPEEASPKPDDPCPEGWQSFP<br>SLSCYKVFAHERIVRKRNWEEAERFCQALGAHLSSFSHVDEIKEF<br>LHFLTDQFSGQHWLWIGLNKRSPDLQGSWQWSDRTPVSTIIMP<br>NEFQQDYDIRDCAAVKVFHRPWRRGWHFYDDREFIYLRPFACD<br>TKLEWVCQIPKGRTPKTPDWYNPDRAIGHGPPLIEGSEYWFVAD<br>LHLNIEEAVLYCASNHSFLATITSFVGLKAIKNKIANISGDGQKWW<br>IRISEWPIDDHFTYSRYPWHRFPVTFGEELYMSAKTWLIDLGKP<br>TDCSTKLPFICEKYNVSSLEKYS PDSA AKVQCSEQWIPFQNK CFL<br>KIKPVSLTFSQASDTCHSYGGTLPVLSQIEQDFITSLLPDMEATL<br>WIGLRWTAYEKINKWTDNRELTYSNFHPLLVSGRRLRIPENFFEEE<br>SRYHCALILNLQKSPFTGTWNFTSCSERHFVSLCQKYSEVKSQR<br>TLQNASETVKYLNLYKIIPKTLTWHS AKRECLKSNMQLVSITDPY<br>QQAFLSVQALLHNSSLWIGLFSQDDELNFGWSDGKRLHFSRWA<br>ETNGQLED CVLDTDGFWKTVD CNDNQP GAICYYS GNETEKEV<br>KPVDSVKCPSPVLNTPWIPFQNCY NFITKNRHMATTQDEVHTK<br>CQKLNPKSHLSIRDEKENNFVLEQLLYFN YMASWMLGITYRNK<br>SLMWFDKTPLSYTHWRAGRPTIKNEKFLAGLSTDGFWDIQTFKVI<br>EEAVYFHQHSILACKIEMVDYKEEYNTTLPQFMPYEDGIYSVIQKK |

(continuación)

|    |                |   |
|----|----------------|---|
|    |                | VTWYEALNMCSQSGGHLASVHNQNGQLFLEDIVKRDGFPLWWG<br>LSSHDGSESSFWDGSTFDYIPWKGQTSPGNCVLLDPKGTWK<br>HEKCNSVKDGAICYKPTKSKKLSRLTYSSRCPAAKENGSRWQY<br>KGHCYKSDQALHSFSEAKKLCSKHDHSATIVSIKDEDENKFVSRL<br>MRENNNITMRVWLGLSQHSVDQSWSWLDGSEVTFVKWENKSK<br>SGVGRCSMLIASNETWKKVECEHGFGRVCKVPLGPDYTAIAIV<br>ATLSILVLMGGLIWFLFQRHRLHLAGFSSVRYAQGVNEDEIMLPS<br>FHD |
| 16 | A1_VH_FR1      | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYS  |
| 17 | A1_VH_FR2      | WVRQAPGKGLEWVG  |
| 18 | A1_VH_FR3      | RFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTI  |
| 19 | A1_VH_FR4      | WGQGTTLTVSS   |
| 20 | A1_VL_FR1      | DVQMTQSPSSLSASVGDRVITC  |
| 21 | A1_VL_FR2      | WYQQRPGKAPNLLIY   |
| 22 | A1_VL_FR3      | GVPSRFSGSGSGTDFTLTISTLQPEDFATYYC  |
| 23 | A1_VL_FR4      | FGQGTKVEIKR   |
| 24 | LY75 609-618   | WEVKDCRSFK  |
| 25 | LY75 651-662   | PASLSCYKVFHA  |
| 26 | LY75 761-780   | PWRRGWHFYDDREFIYLRPF  |
| 27 | LY75 883-901   | DDHFTYSRYPWHRFPVTFG   |
| 28 | LY75 1029-1040 | RELTYSNFHPLL  |
| 29 | LY75 1077-1093 | FTSCSERHVFSLCQKYS   |
| 30 | LY75 1107-1118 | TVKYLNNLYKII  |
| 31 | LY75 1368-1378 | EAVYFHQHSIL   |
| 32 | LY75 1518-1528 | KKLSRLTYSSC   |
| 33 | LY75 1535-1554 | NGSRWQYKKGHCYKSDQALH  |
| 34 | LY75 877-901   | ISEWPIDDHFTYSRYPWHRFPVTFG   |
| 35 | LY75 1099-1118 | QTLQNASETVKYLNNLYKII  |
| 36 | LY75 883-892   | DDHFTYSRYP  |

(continuación)

|    |                      |  |
|----|----------------------|--|
| 37 | LY75 1077-1091       | FTSCSERHFVSLCQK  |
| 38 | Rituximab VH         | QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWWKQTPG<br>RGLIEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSL<br>TSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSV<br>FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT<br>FPAVLQS<br>SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCD<br>KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDV<br>SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL<br>HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP<br>SRD<br>ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS<br>DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL<br>SPGK |
| 39 | Rituximab VL         | QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKP<br>WYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSSYSLTISRVEAEDAATYYCQQ<br>WTSNPPTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL<br>LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSST<br>LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC   |
| 40 | Rituximab<br>VH_CDR1 | SYNMH  |
| 41 | Rituximab<br>VH_CDR2 | AIYPGNGDTSYNQKFKG  |
| 42 | Rituximab<br>VH_CDR3 | STYYGGDWYFNV   |
| 43 | Rituximab<br>VL_CDR1 | RASSSVSYIH   |
| 44 | Rituximab<br>VL_CDR2 | ATSNLAS  |
| 45 | Rituximab<br>VL_CDR3 | QQWTSNPPTF   |
| 46 | (765-772)            | GWHFYDDR   |
| 47 | (877 a 890)          | ISEWPIDDHFTYSR   |
| 48 | (896-910)            | FPVTFGEECLYMSAK  |
| 49 | (1030-1044)          | ELTYSNFHPLLVSGR  |

(continuación)

|    |             |                 |
|----|-------------|-----------------|
| 50 | (1084-1091) | HFVSLCQK        |
| 51 | (1099-1109) | QTLQNASETVK     |
| 52 | Conector    | Gly-Phe-Leu-Gly |

5 *Texto libre de listado de secuencias:*

SEQ ID NO: 38 <223> Secuencia de VH de rituximab  
 SEQ ID NO: 39 <223> Secuencia de VL de rituximab  
 SEQ ID NO: 40 <223> Rituximab VH\_CDR1  
 10 SEQ ID NO: 41 <223> Rituximab VH\_CDR2  
 SEQ ID NO: 42 <223> Rituximab VH\_CDR3  
 SEQ ID NO: 43 <223> Rituximab VL\_CDR1  
 SEQ ID NO: 44 <223> Rituximab VL\_CDR2  
 SEQ ID NO: 45 <223> Rituximab VL\_CDR3  
 15 SEQ ID NO: 52 <223> Conector  
 SEQ ID NO: 53 a 163 <223> Péptido  
 SEQ ID NO: 165 a 207 <223> Péptido



# REIVINDICACIONES

- 5 1. Combinación farmacéutica, que comprende:  
  
10 (A) un anticuerpo anti-LY75, o una parte de unión a antígeno del mismo, en donde dicho anticuerpo o parte comprende:  
  
15 a) una región variable de cadena pesada que comprende:  
  
i) una primera vhCDR que comprende la SEQ ID NO: 5,  
ii) una segunda vhCDR que comprende la SEQ ID NO: 6, y  
15 iii) una tercera vhCDR que comprende la SEQ ID NO: 7, y  
  
b) una región variable de cadena ligera que comprende:  
  
20 i) una primera vlCDR que comprende la SEQ ID NO: 8,  
ii) una segunda vlCDR que comprende la SEQ ID NO: 9, y  
20 iii) una tercera vlCDR que comprende la SEQ ID NO: 10,  
  
en la que el anticuerpo anti-LY75 o una parte de unión a antígeno del mismo comprende, además, una fracción unida covalentemente, y en la que dicha fracción es un maitansinoide, y  
  
25 (B) ibrutinib, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  
  
en la que la combinación farmacéutica se encuentra en la forma de una preparación combinada para la utilización simultánea, separada o secuencial, y en la que la combinación farmacéutica es para la utilización en el tratamiento de linfoma de células B grandes difusas (LCBGD) o linfoma no Hodgkin.  
  
30 2. Combinación farmacéutica para la utilización según se reivindica en la reivindicación 1, en la que el anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo es capaz de ser internalizado por una célula que expresa LY75.  
  
3. Combinación farmacéutica para la utilización según se reivindica en la reivindicación 1 o 2, en la que el anticuerpo anti-LY75 o una parte de unión a antígeno del mismo comprende una región variable de cadena pesada que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % respecto a la SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % respecto a la SEQ ID NO: 2.  
  
40 4. Combinación farmacéutica para la utilización según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el anticuerpo anti-LY75 es un anticuerpo monoclonal IgG1 humano.  
  
5. Combinación farmacéutica para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho maitansinoide es DM4 o DM1.  
  
45 6. Combinación farmacéutica para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que (A) y/o (B) comprenden adicionalmente uno o más diluyentes, excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.  
  
50 7. Combinación farmacéutica para la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el maitansinoide es DM4.

```

SEQ ID No: 11      EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTT
SEQ ID No: 1       EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTYSNAWMSWVRQAPGKGLEWVGRIKSKTDGGTT
SEQ ID No: 12      -----
                    *****:*****

```

```

SEQ ID No: 11      DYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTTTIVT-----
SEQ ID No: 1       DYAAPVQGGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTIEGVVSFDYWGQGLVTVSS
SEQ ID No: 12      -----YFDYWGQGLVTVSS
                    *****:*****

```

## FIGURA 1

```

SEQ ID No: 2       DVQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISDYLSWYQQRPGKAPNLLIYAASNLKTGVPS
SEQ ID No: 13      DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQISSYLNWYQOKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPS
SEQ ID No: 14      -----
                    *:***** ** *:***** *:

```

```

SEQ ID No: 2       RFGSGSGTDFTLTISTLQPEDFATYYCQQSYRSPWTFGQGTKVEIKR
SEQ ID No: 13      RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYG-----
SEQ ID No: 14      -----WTFGQGTKVEIKR
                    *****:*****

```

## FIGURA 2

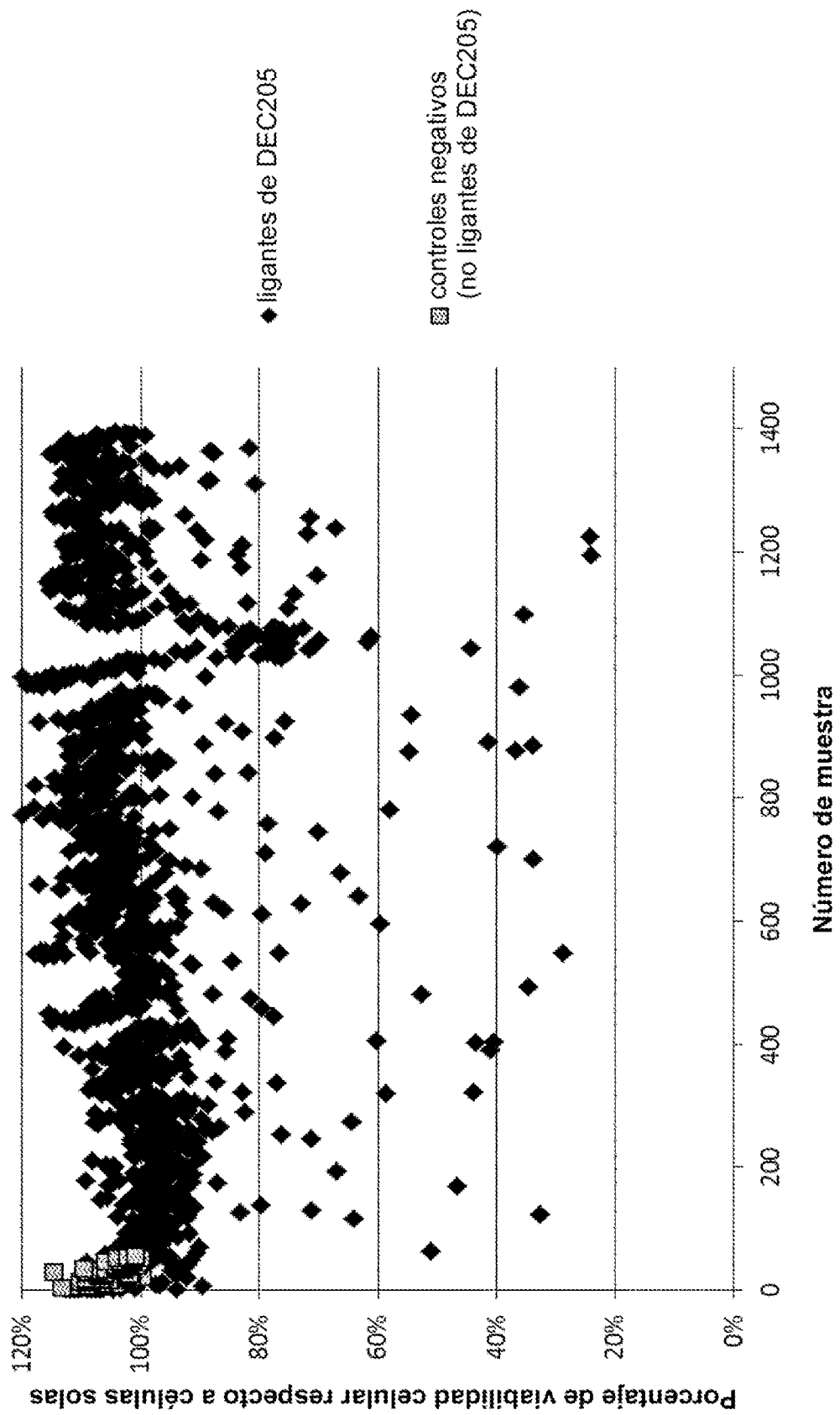


Figura 3a

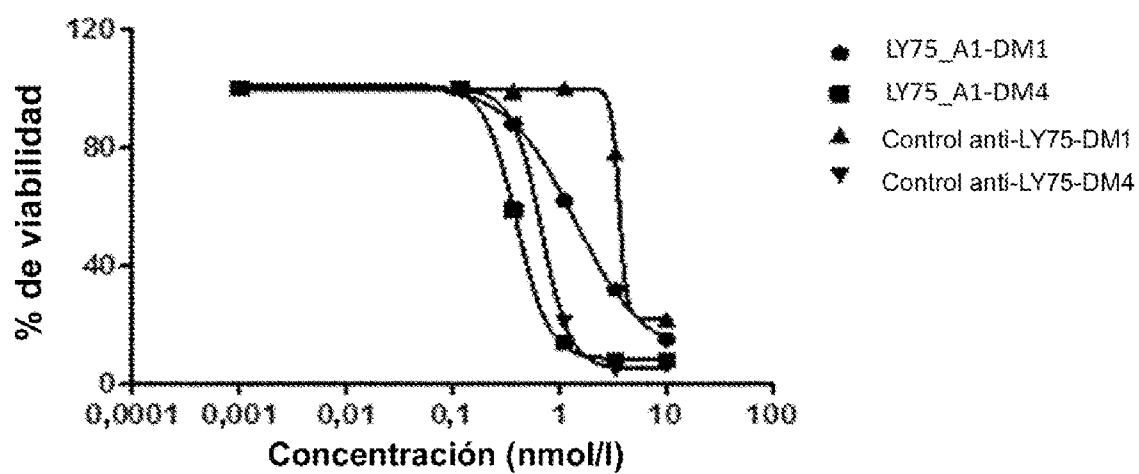


Figura 3b

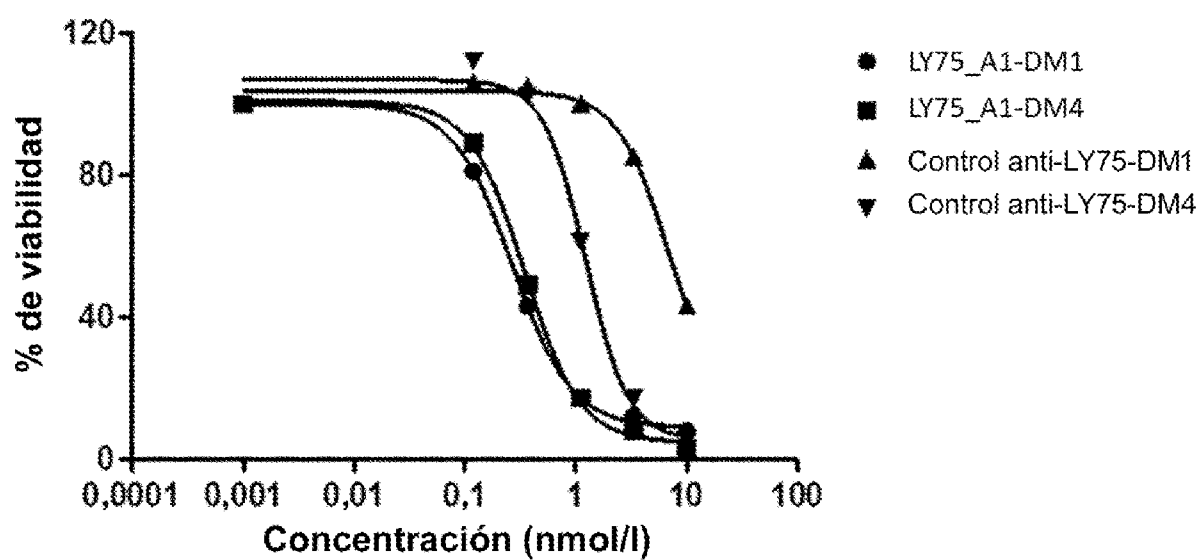


Figura 3c

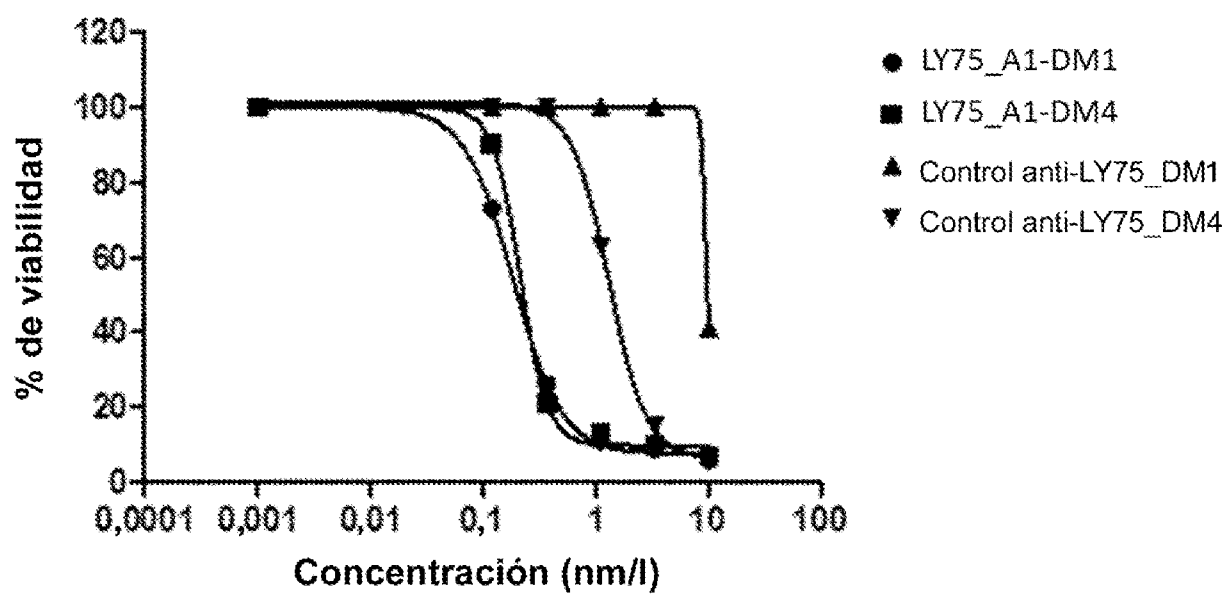


Figura 3d

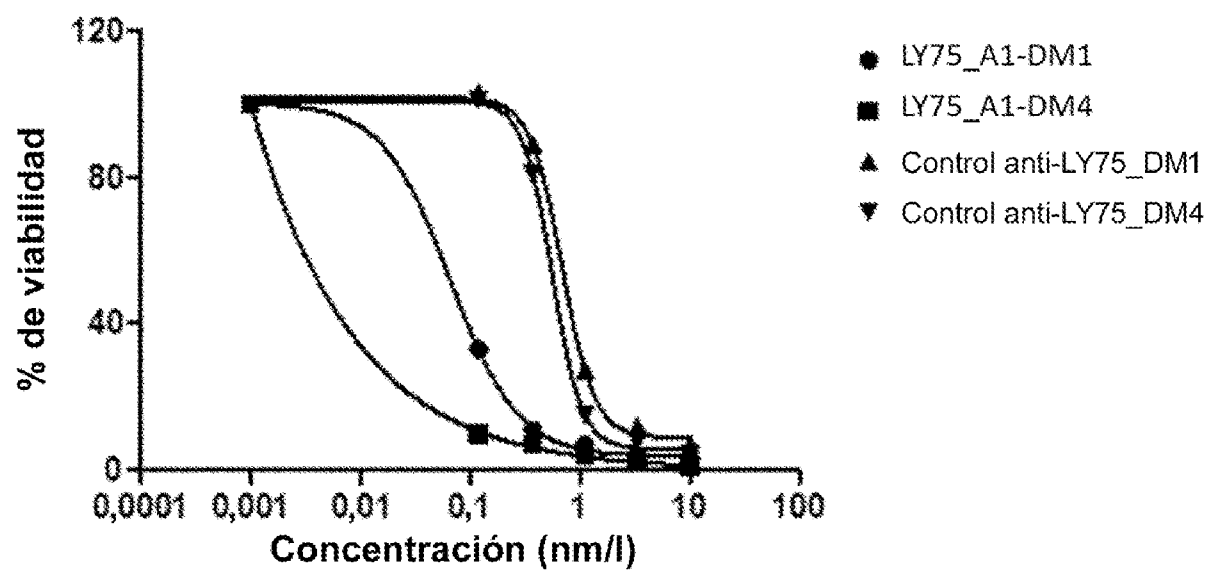


Figura 3e

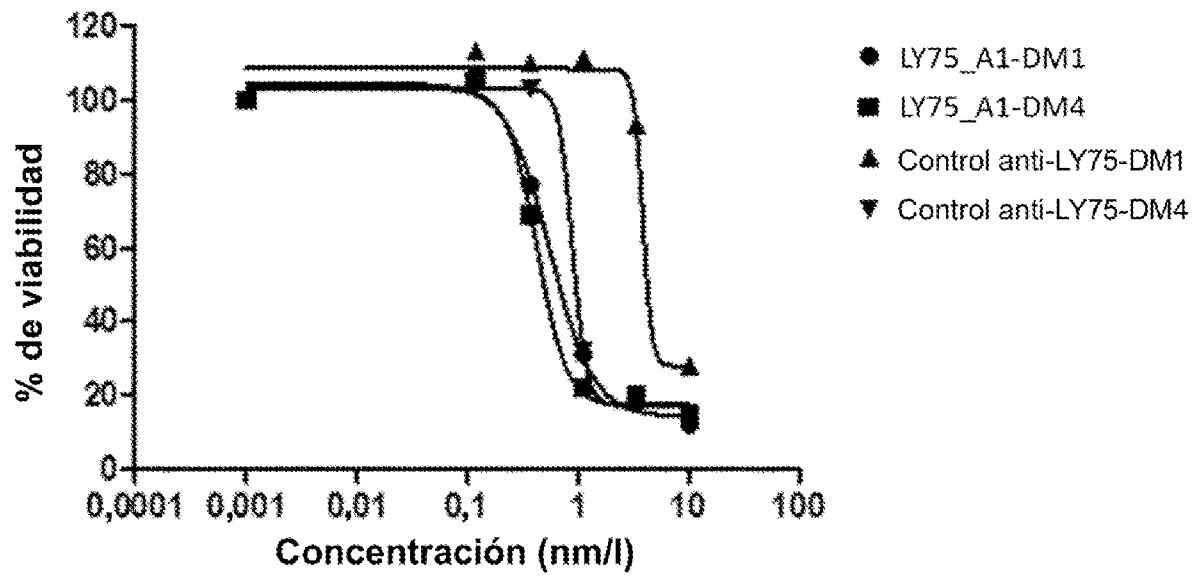


Figura 3f

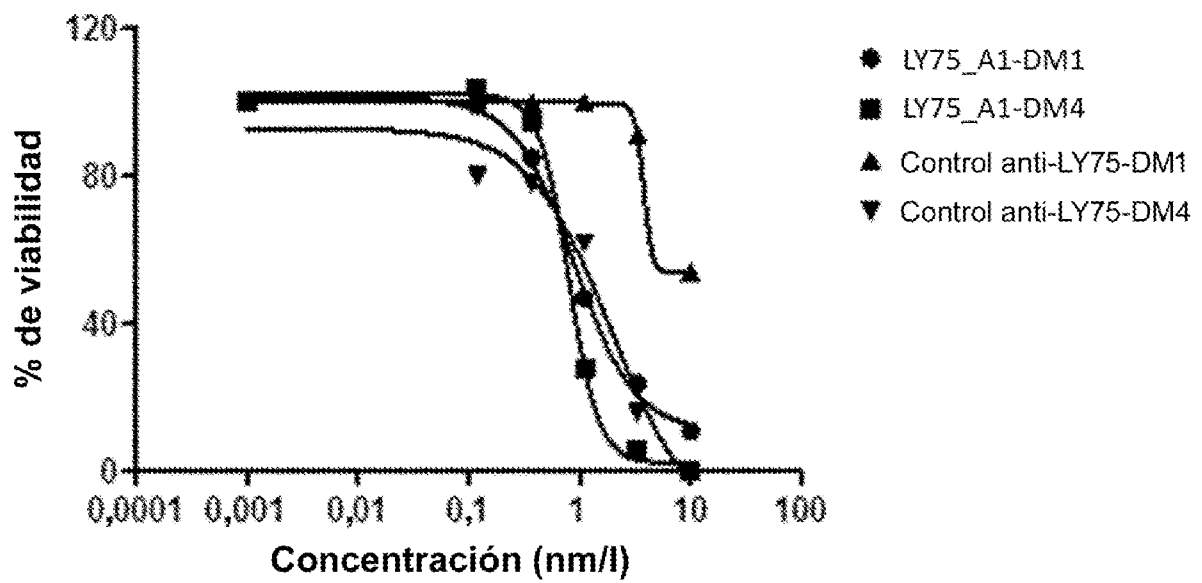


Figura 3g

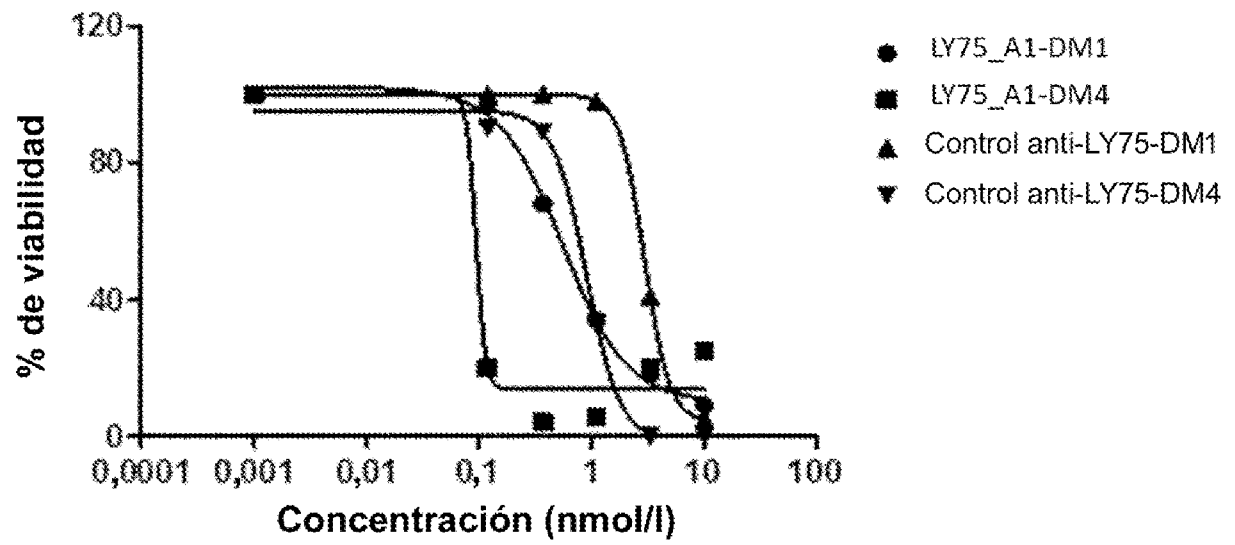


Figura 3h

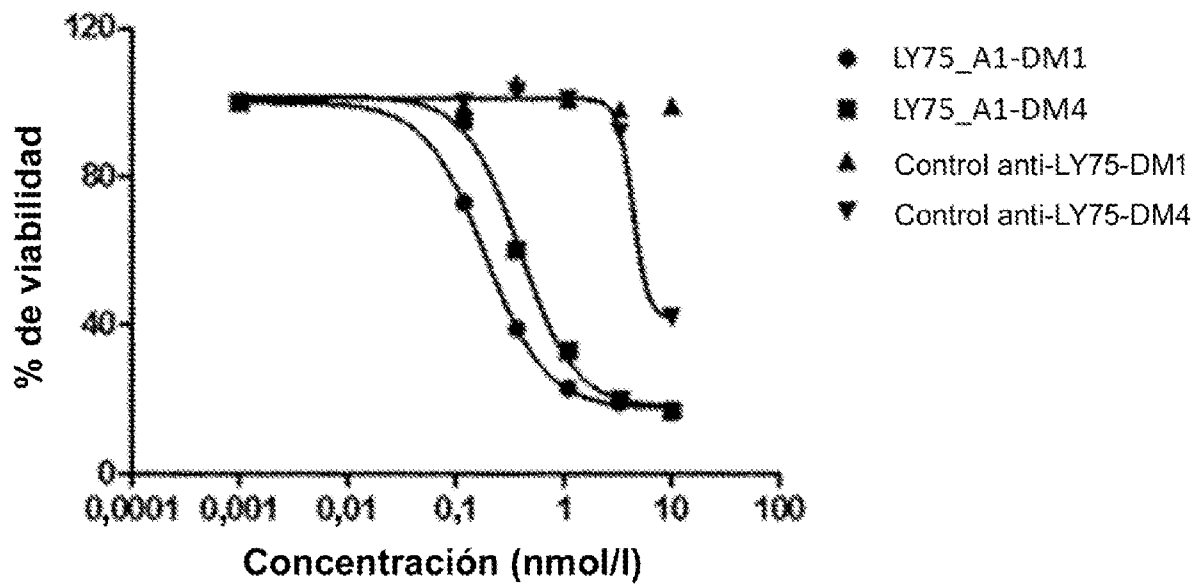


Figura 3i

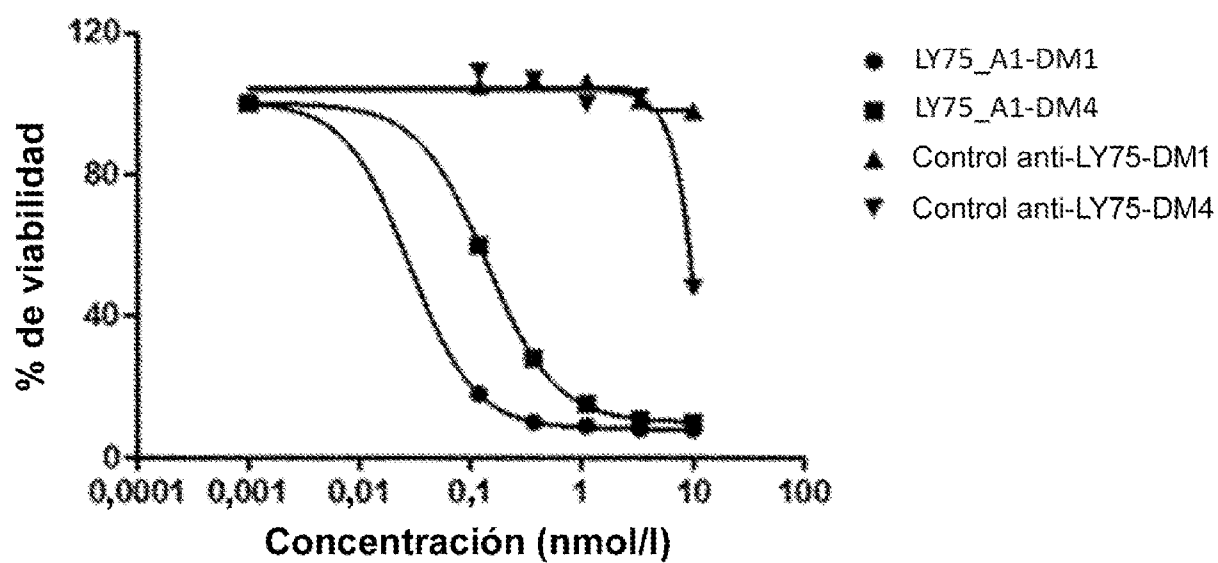


Figura 3j

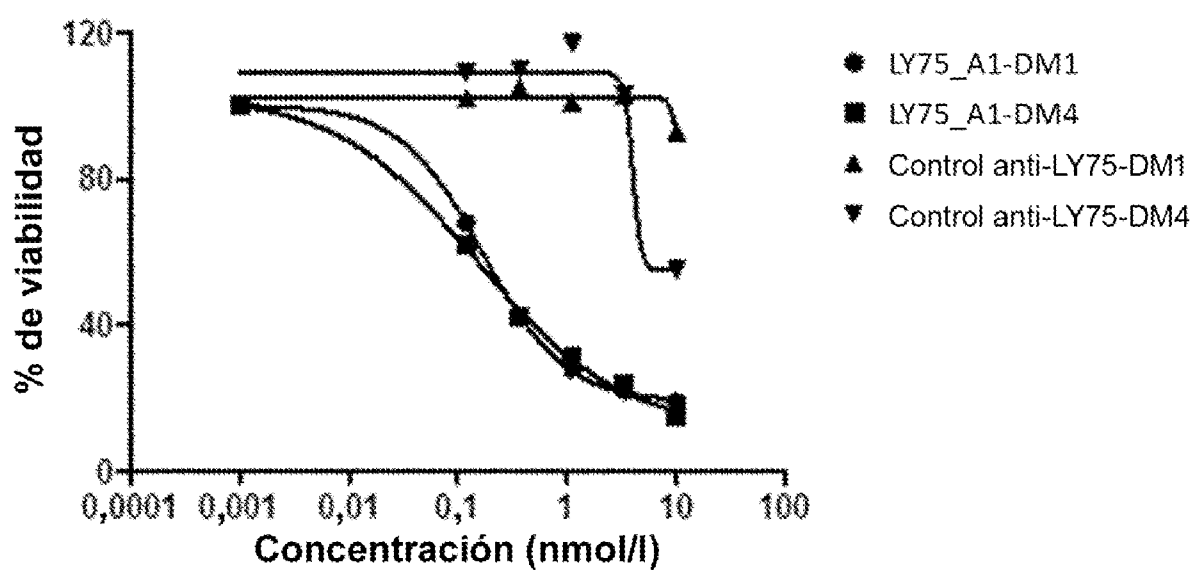


Figura 3k



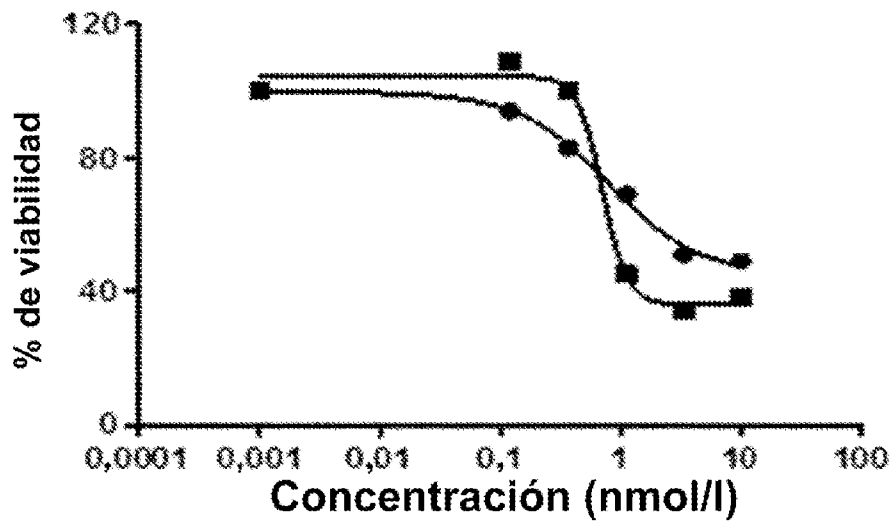


Figura 3l

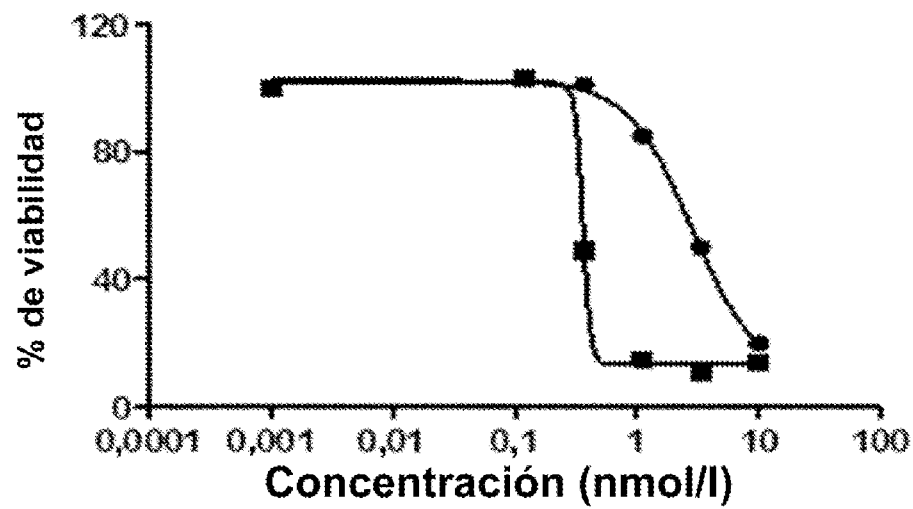


Figura 3m

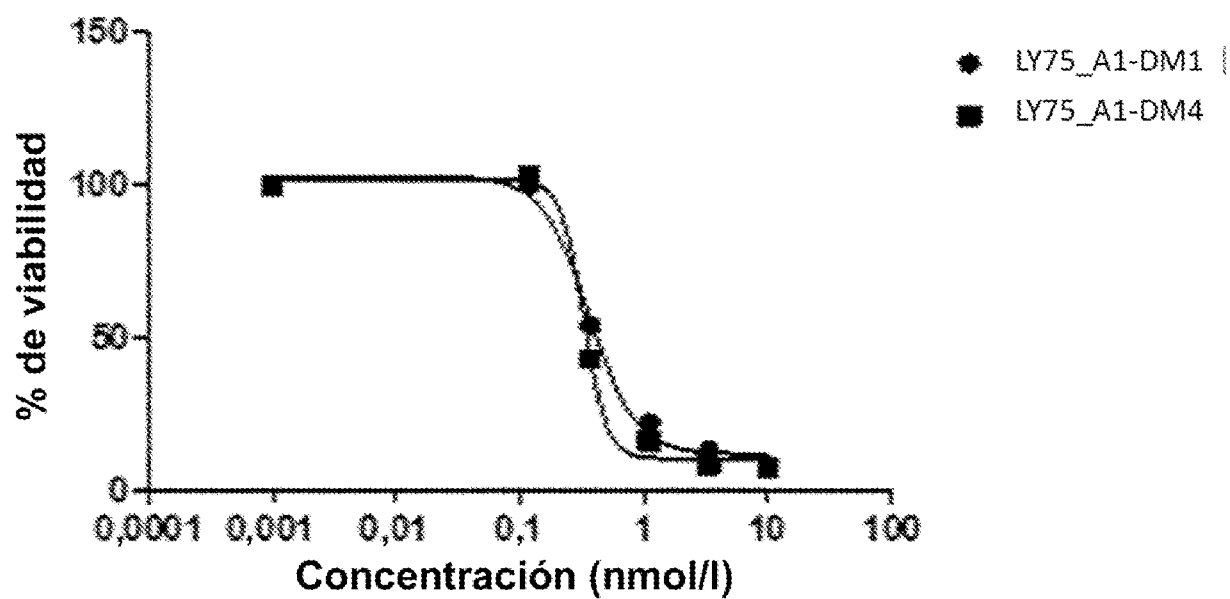


Figura 3n

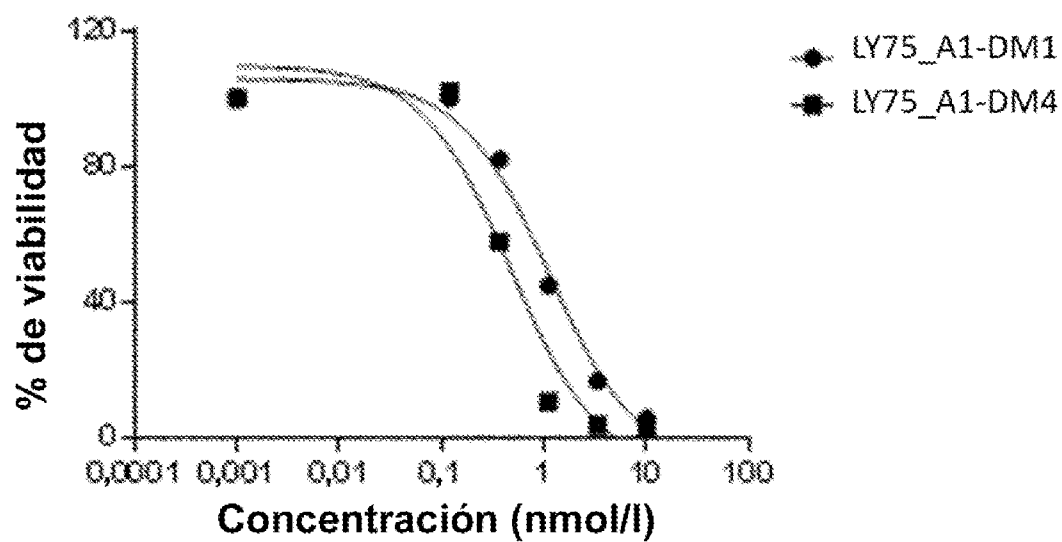


Figura 3o

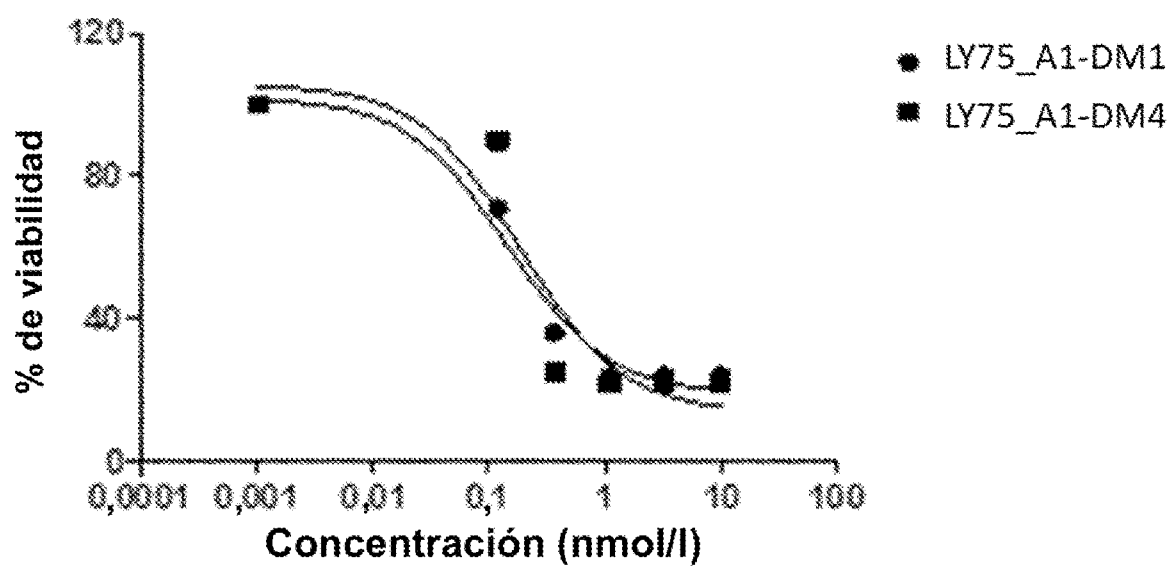


Figura 3p

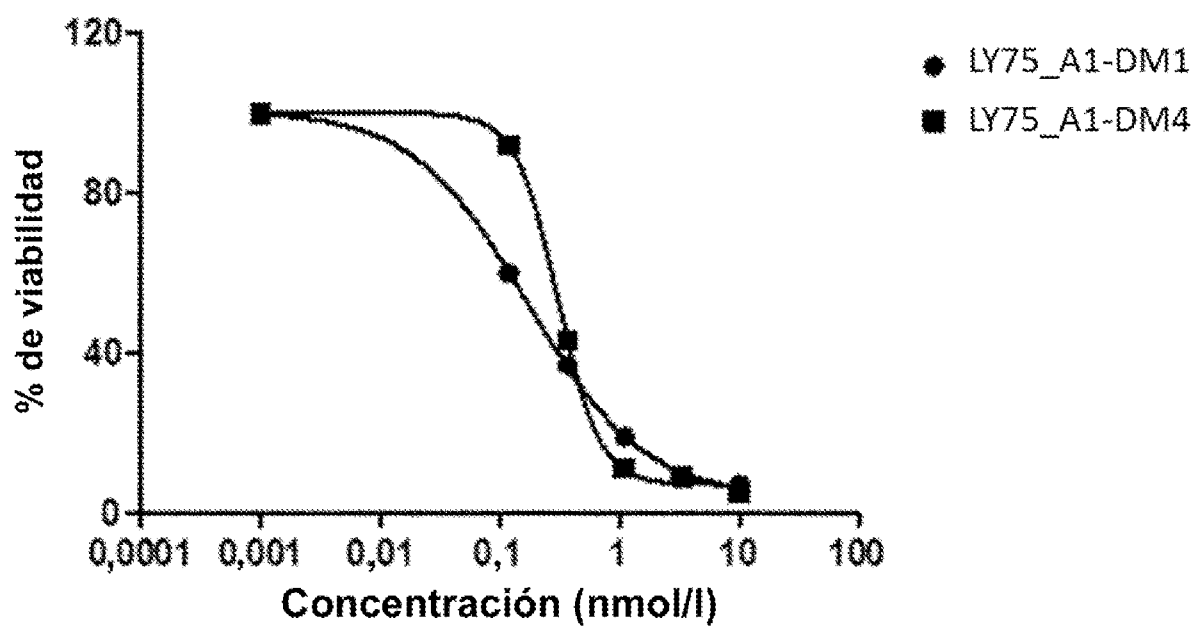


Figura 3q

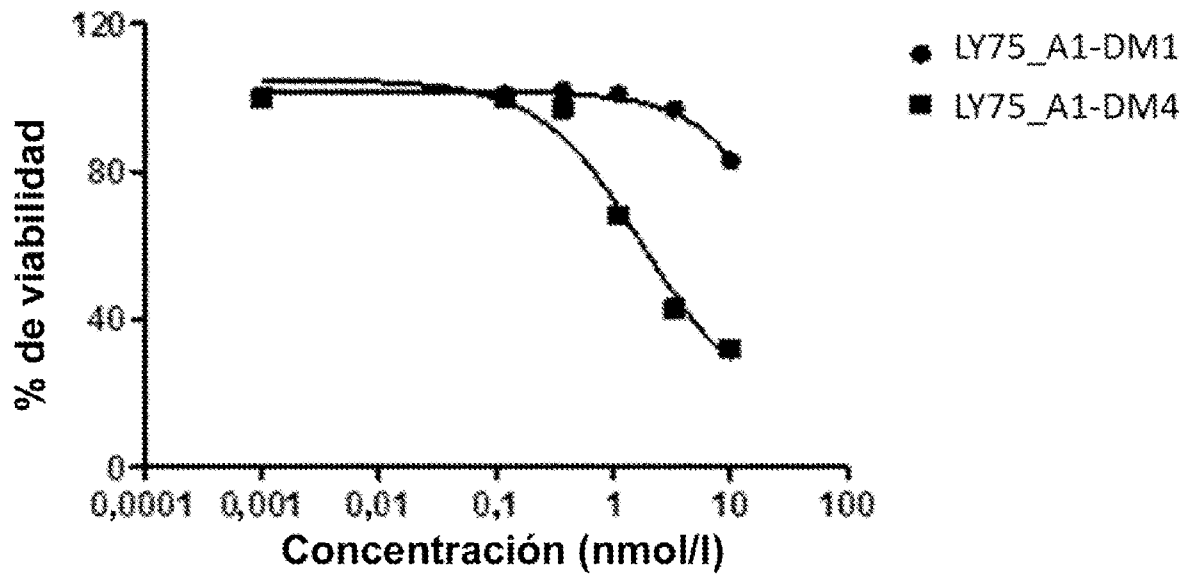


Figura 3r

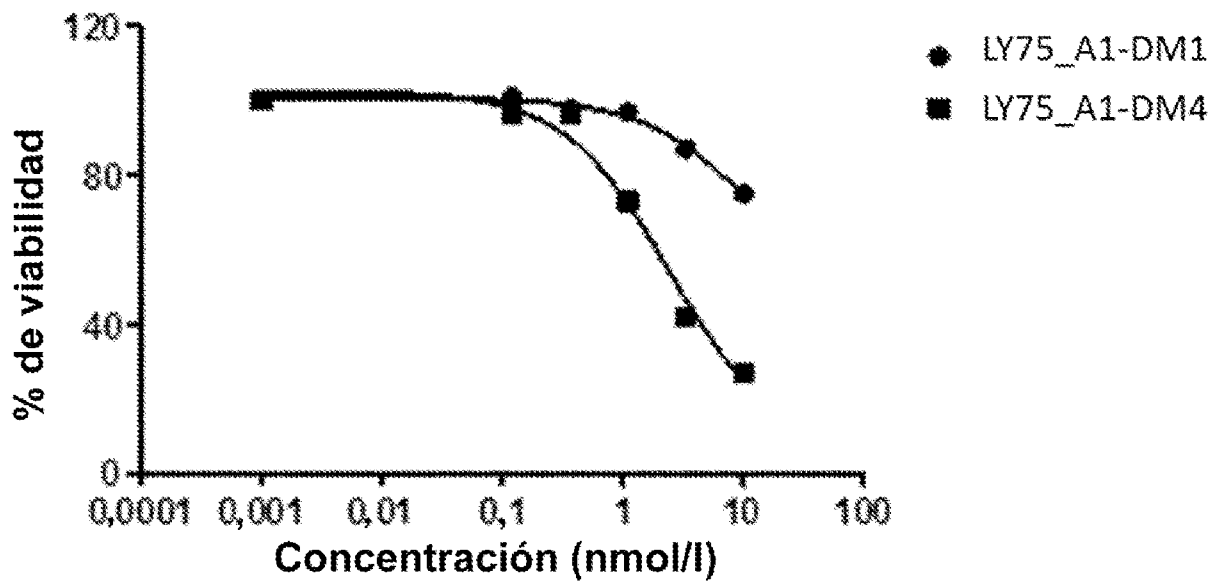


Figura 3s

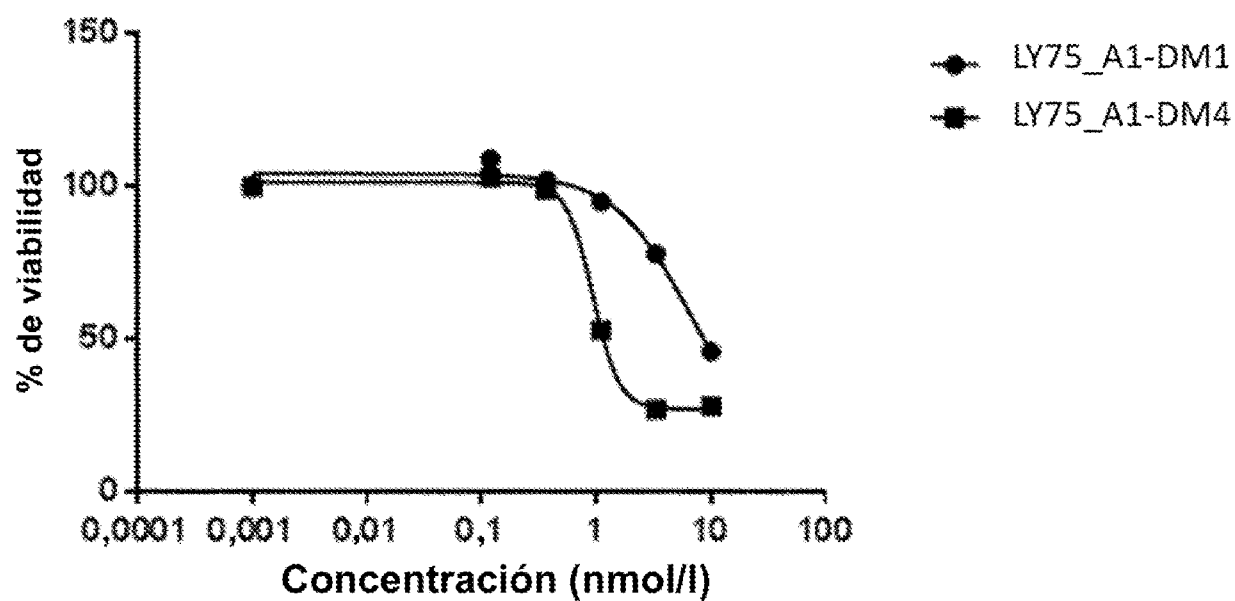


Figura 3t

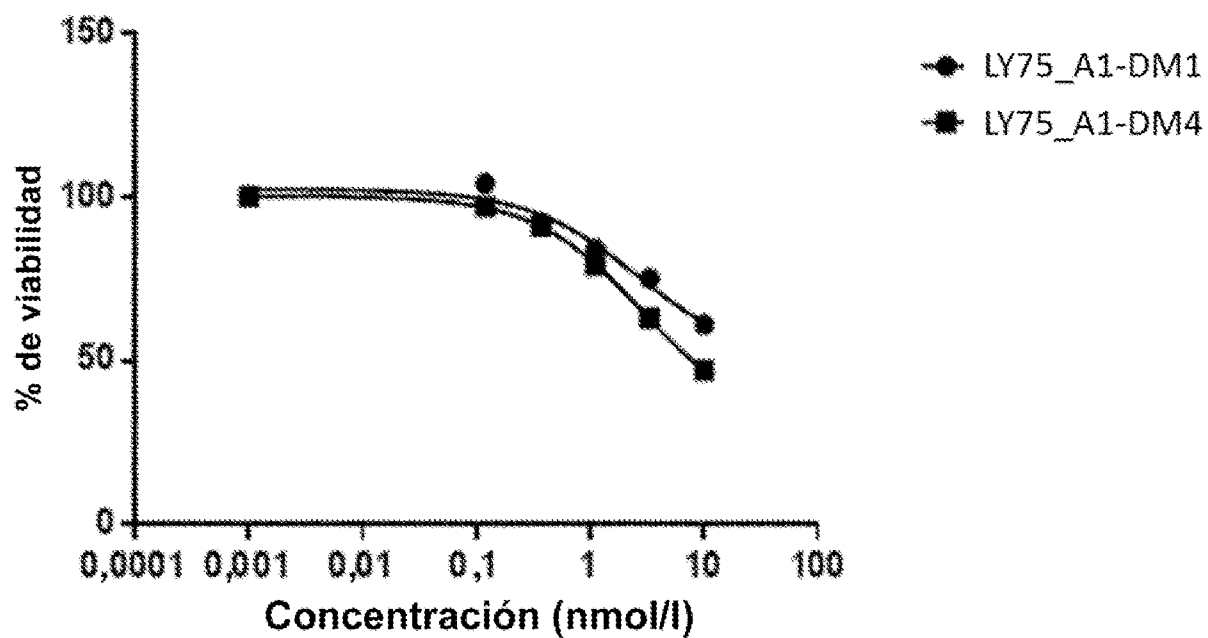


Figura 3u

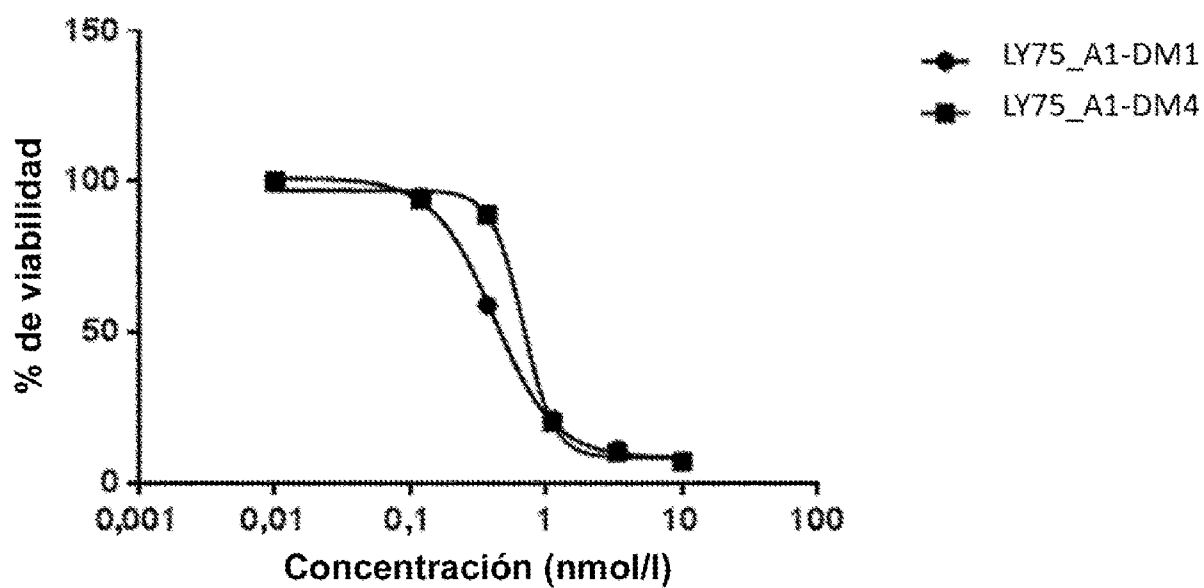


Figura 3v

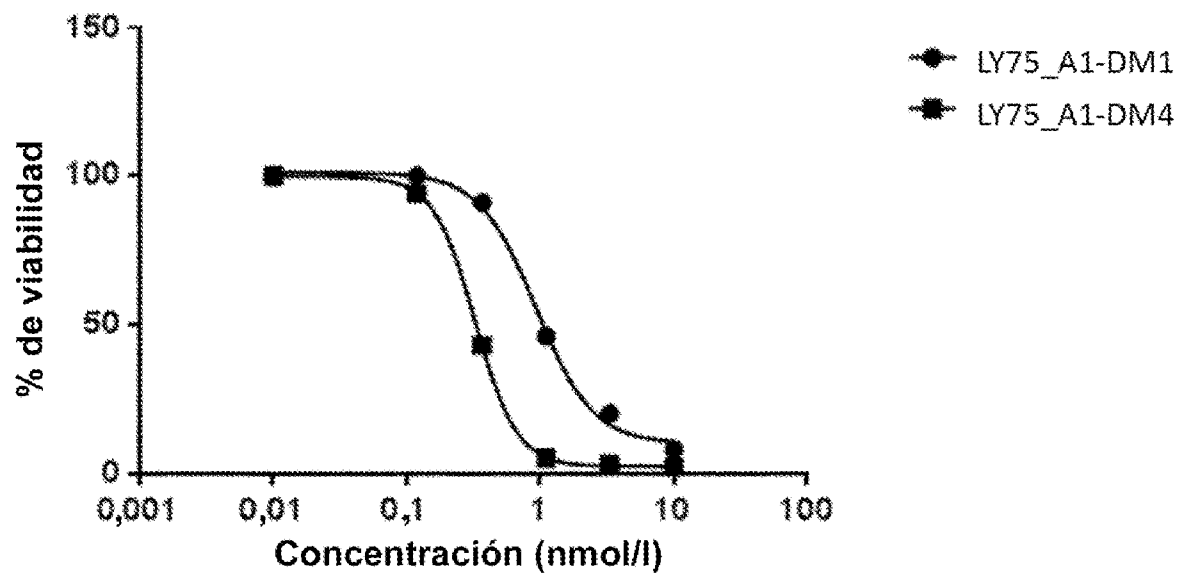


Figura 3w

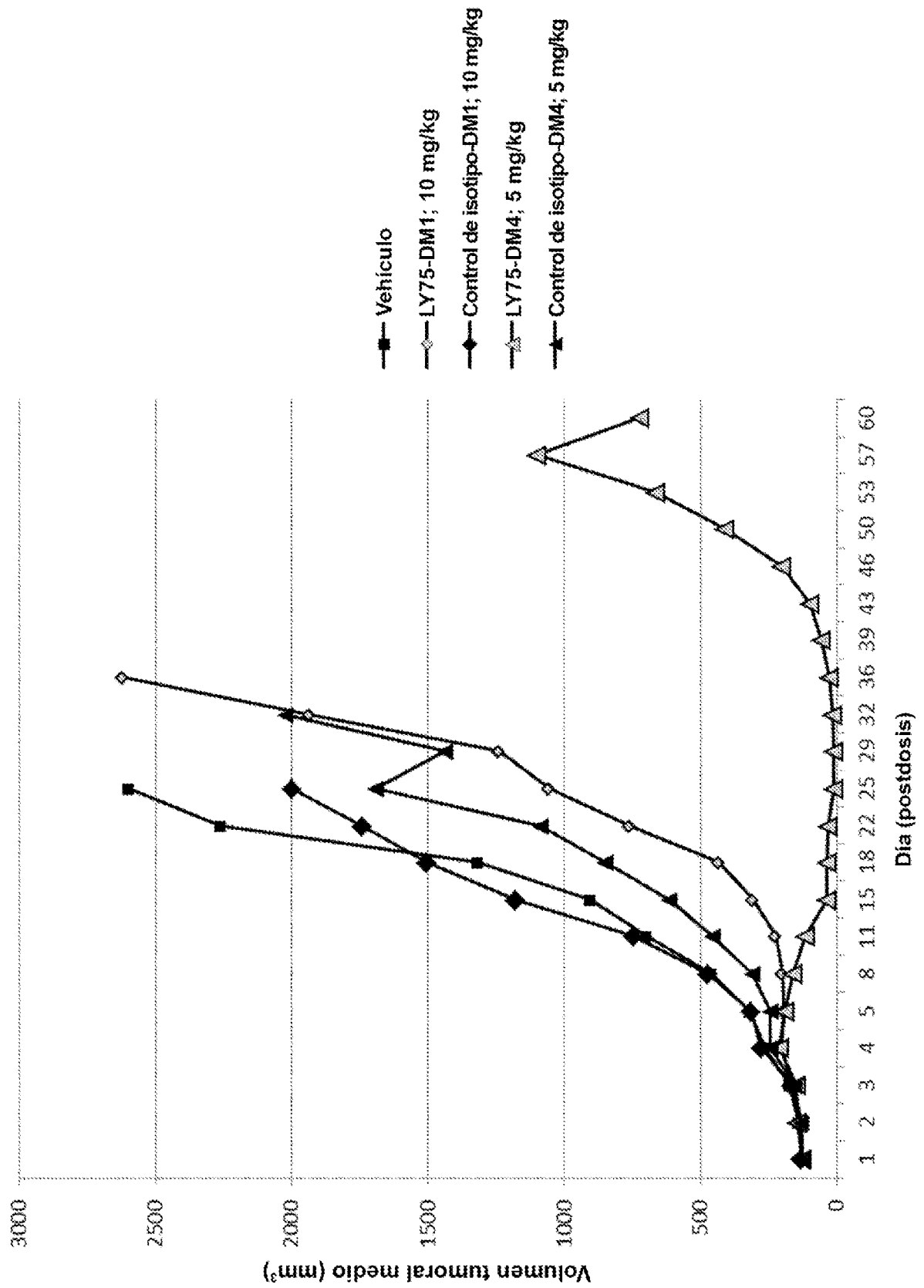


Figura 4a

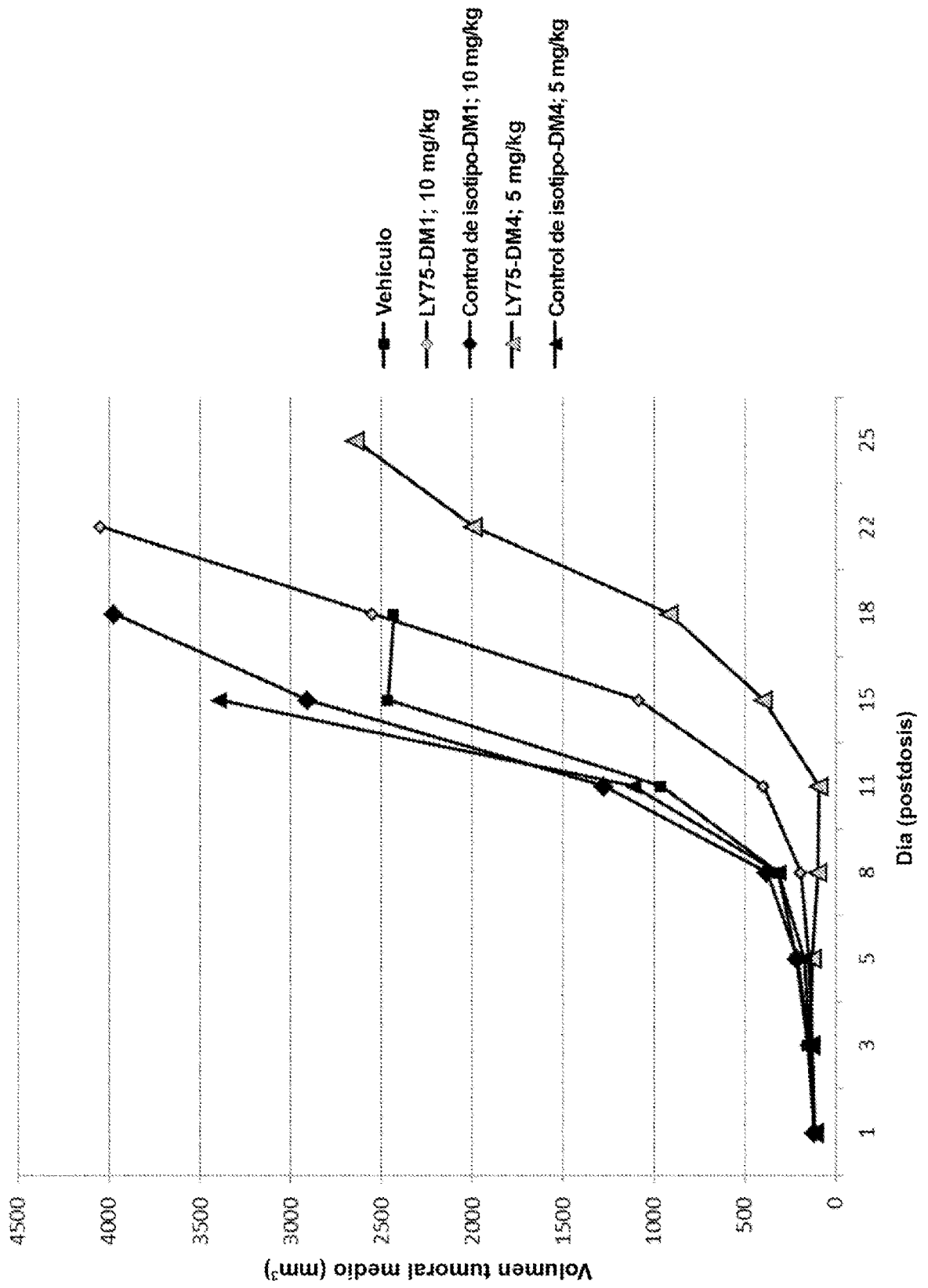


Figura 4b



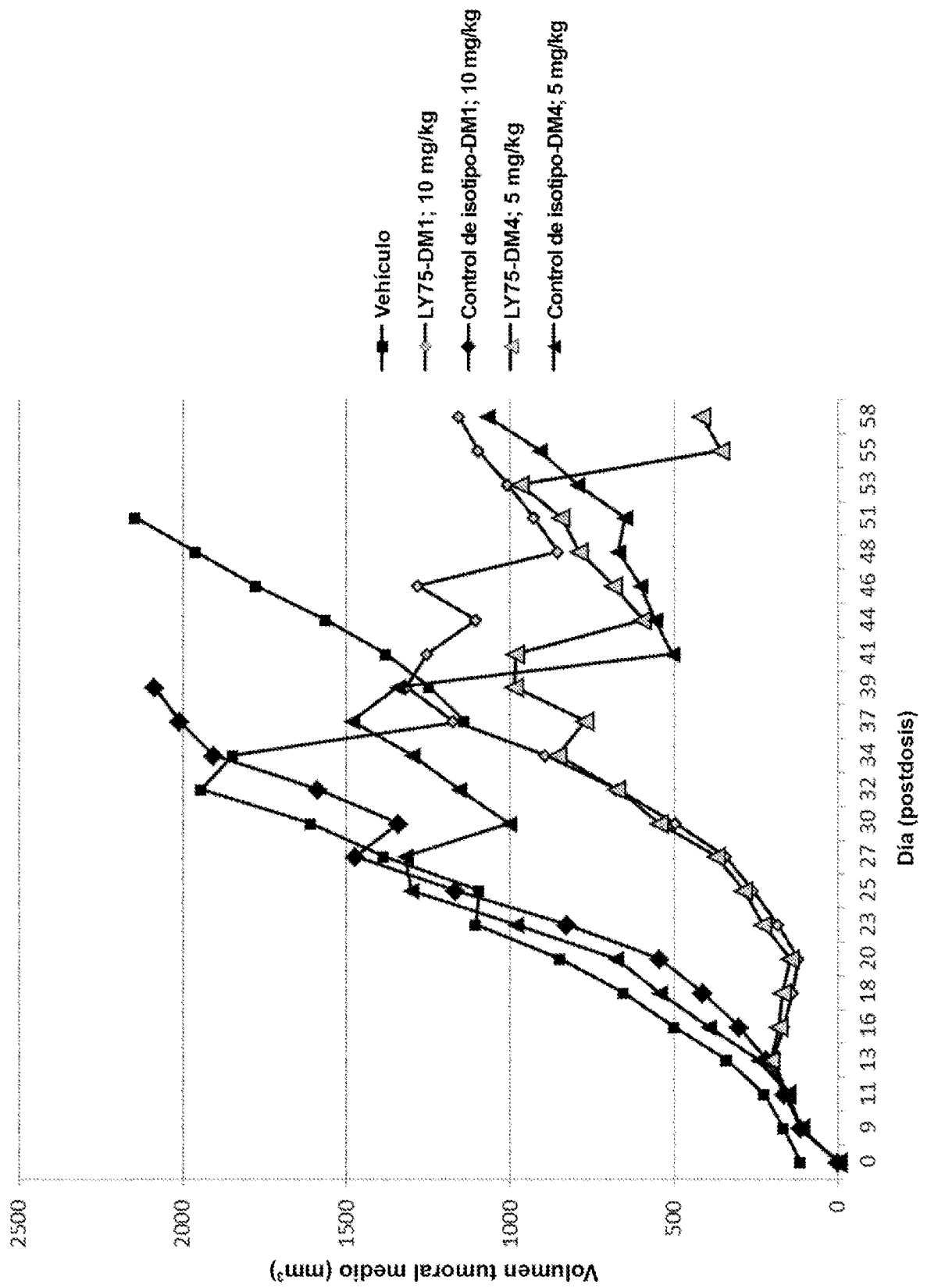


Figura 4c

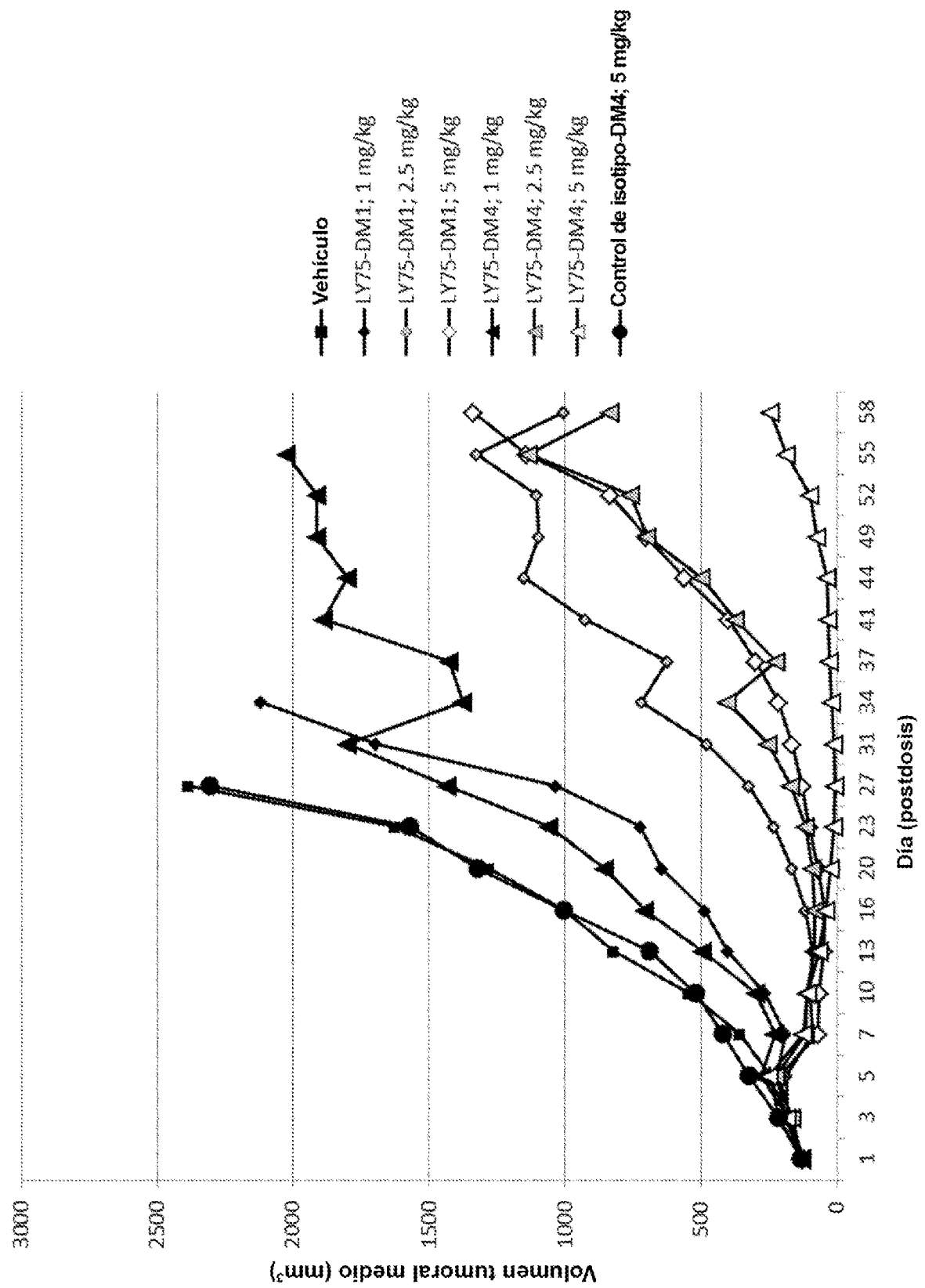


Figura 4d

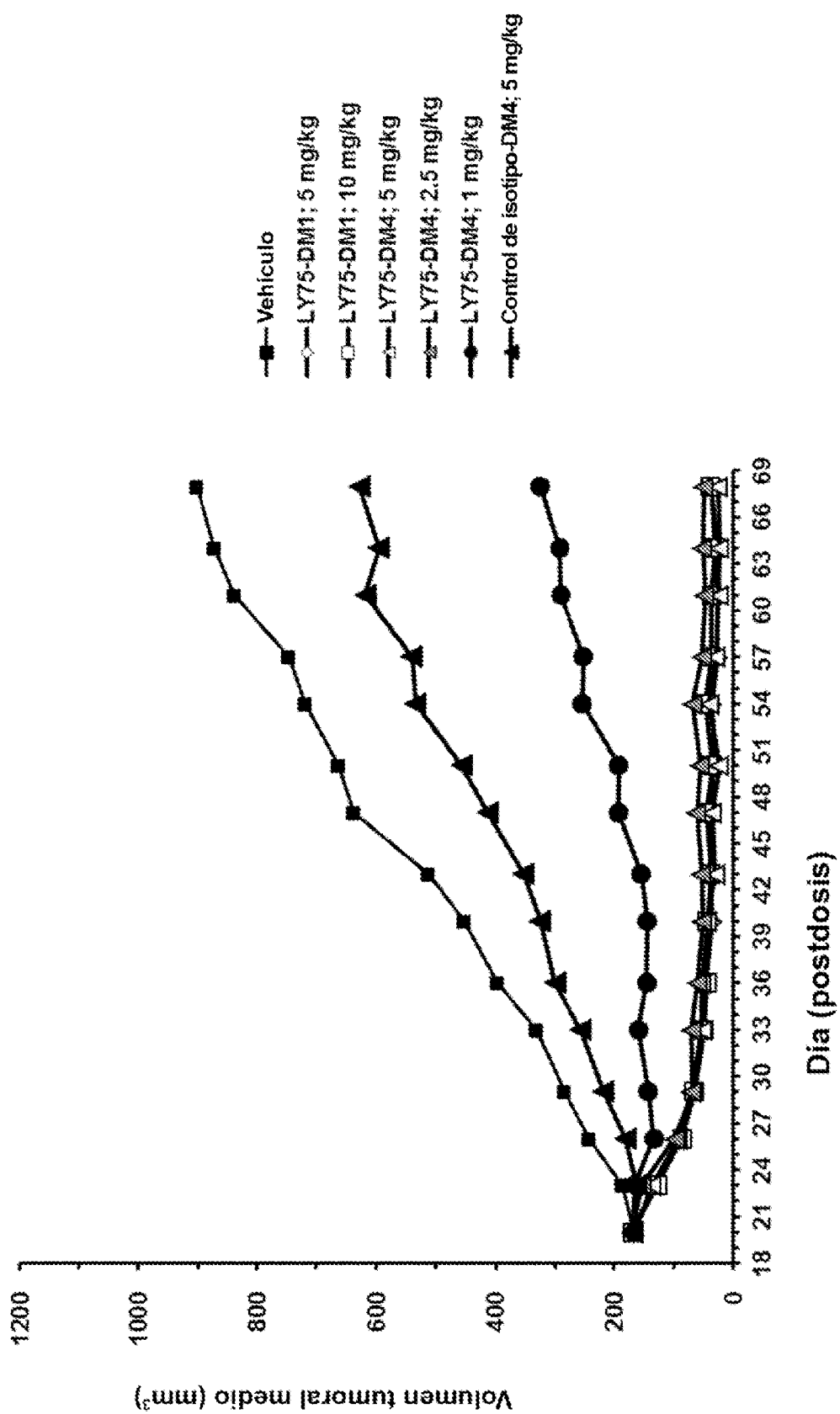


Figura 4e

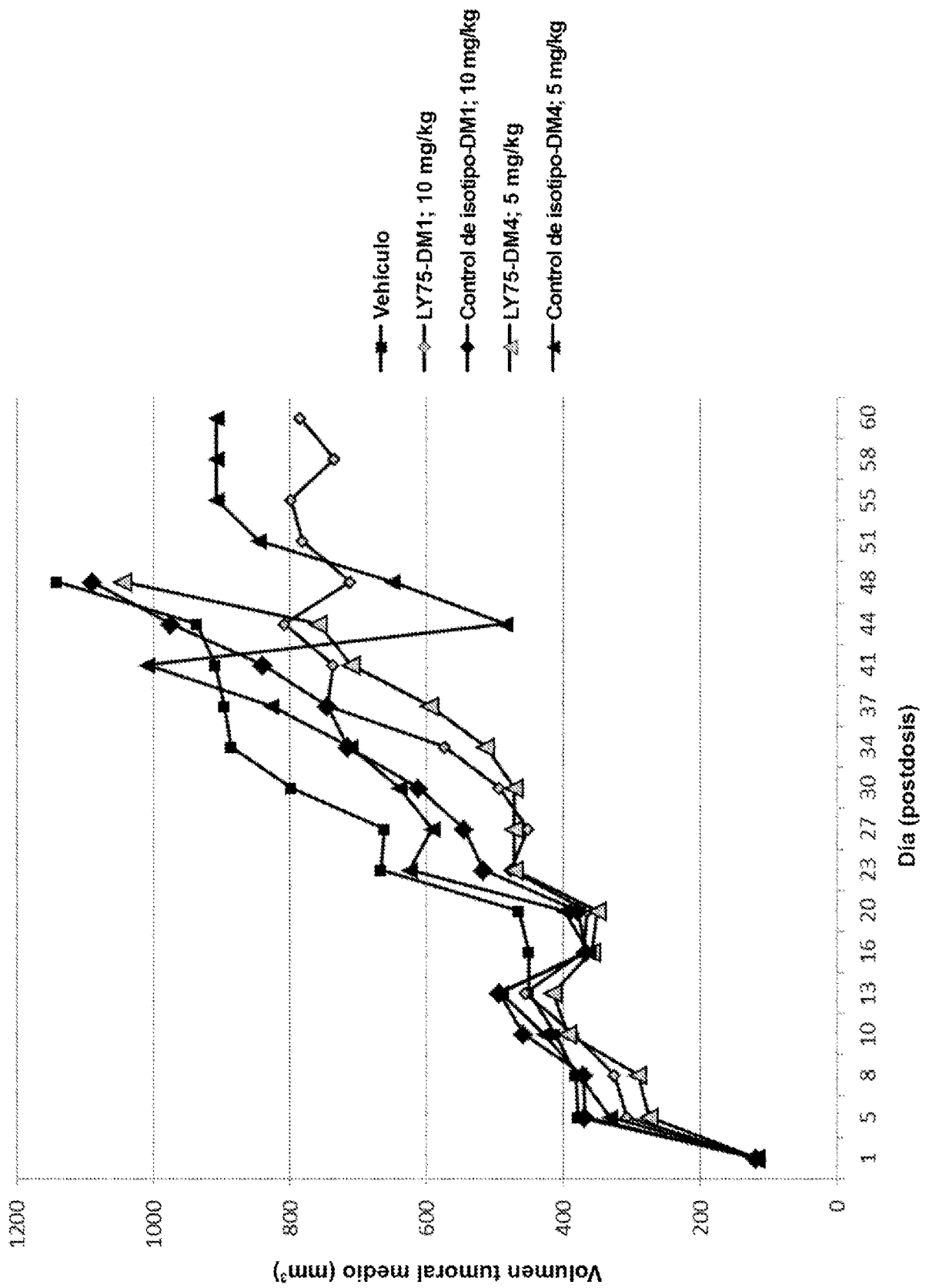


Figura 4f

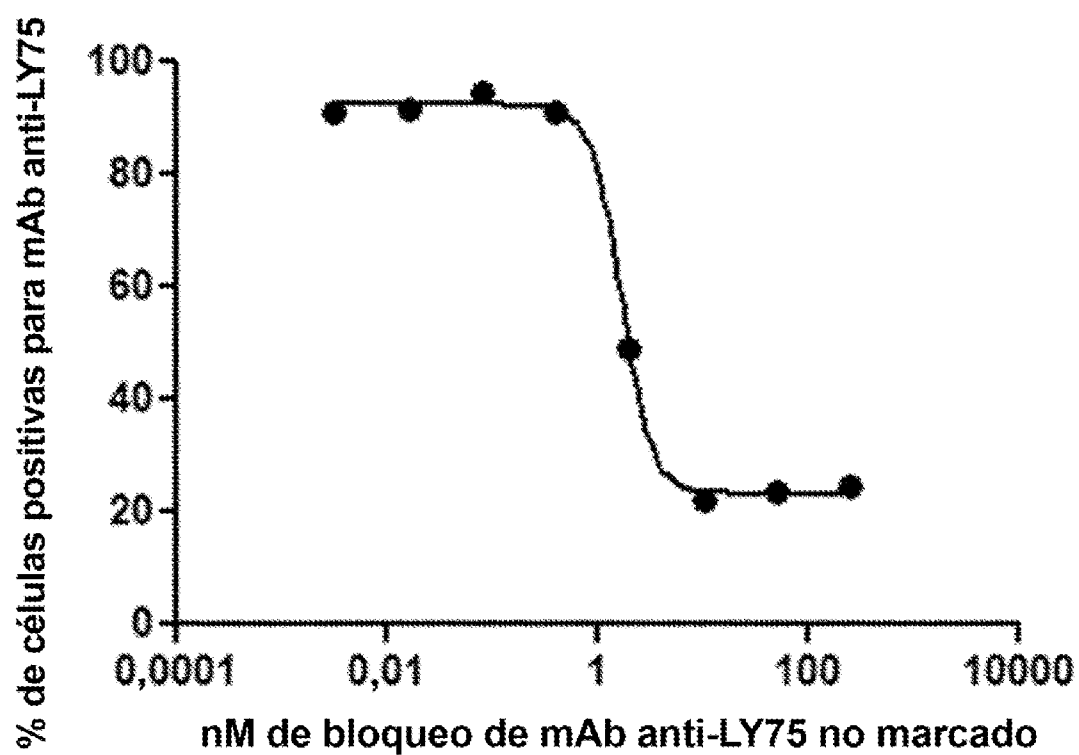


Figura 5a

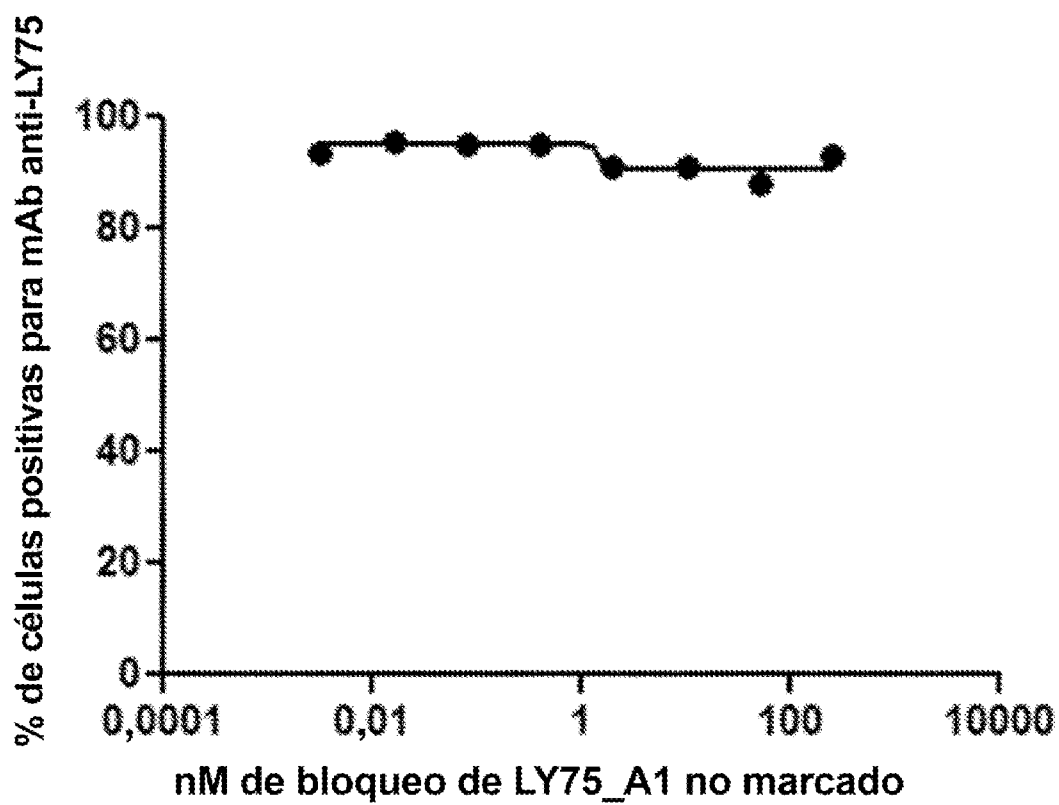
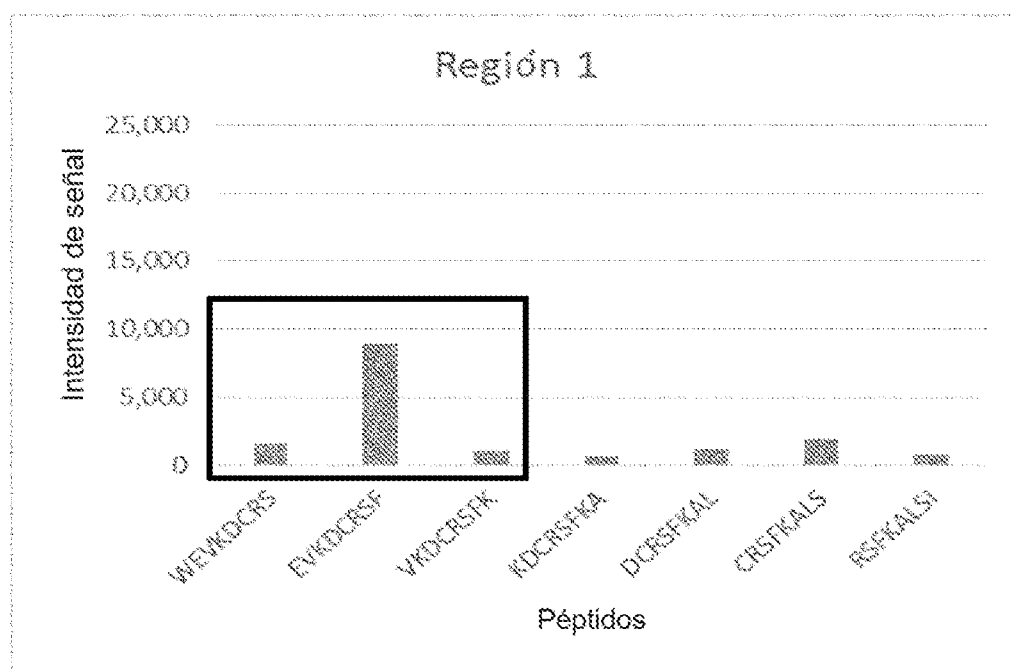
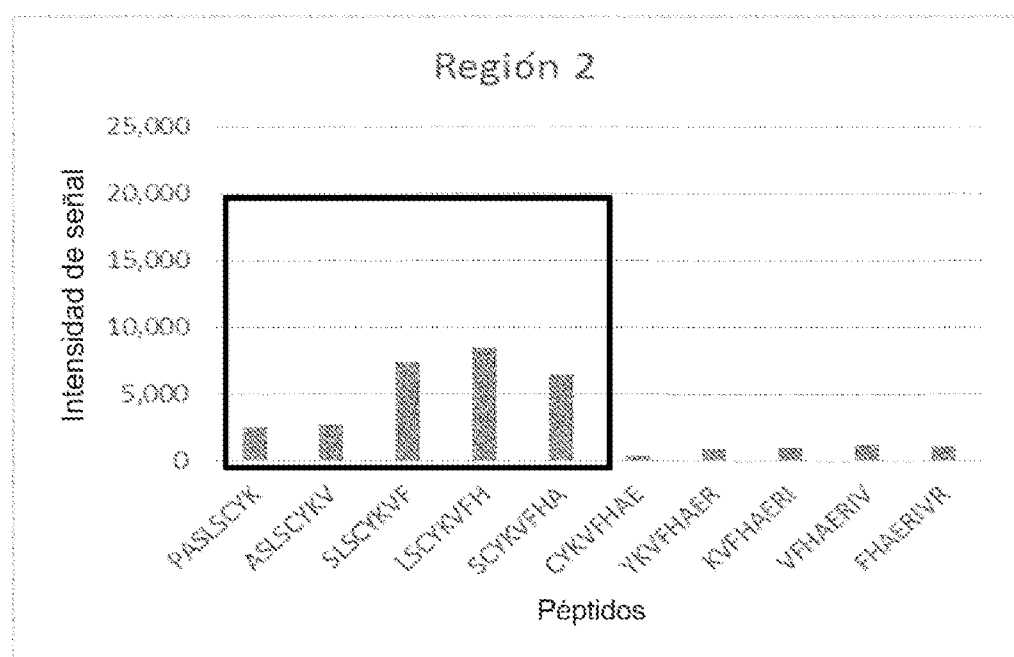


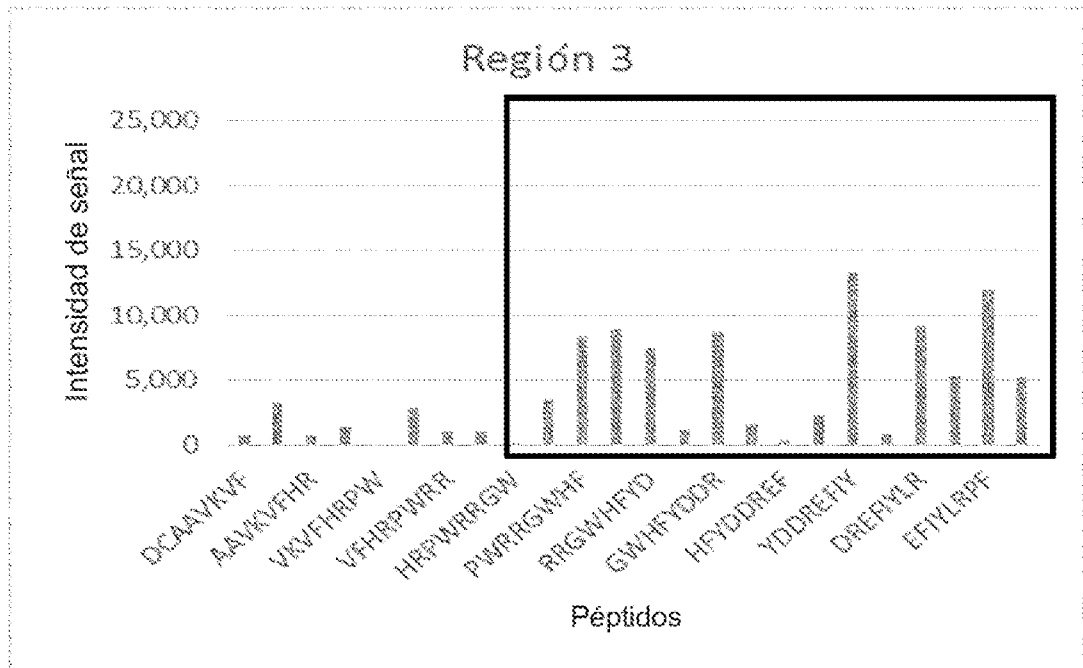
Figura 5b



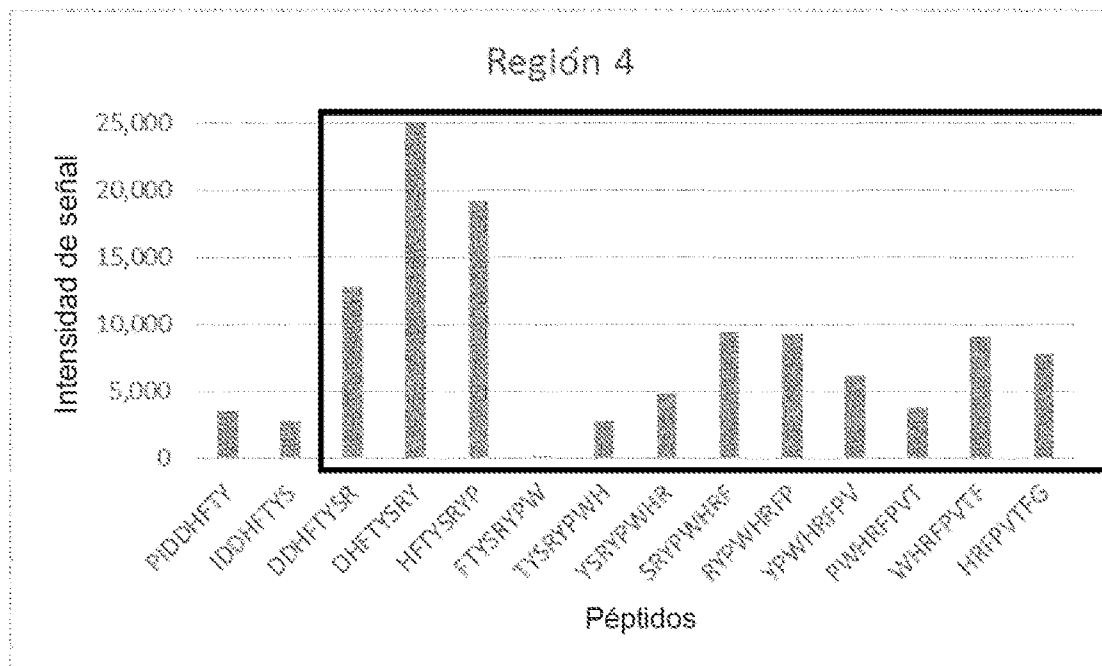
**Figura 6a**



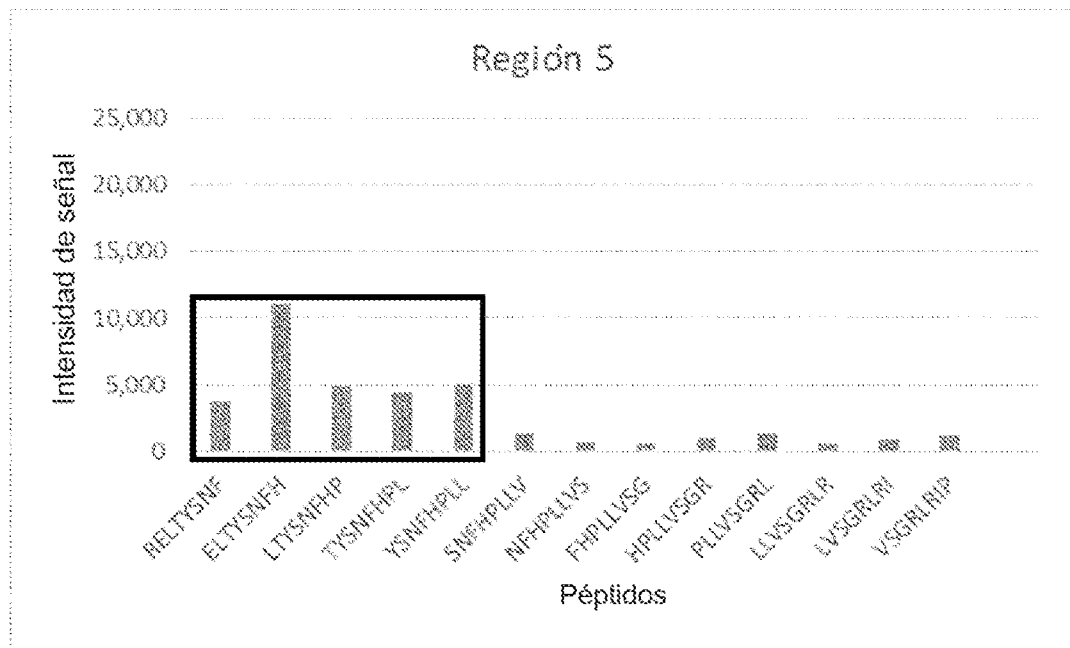
**Figura 6b**



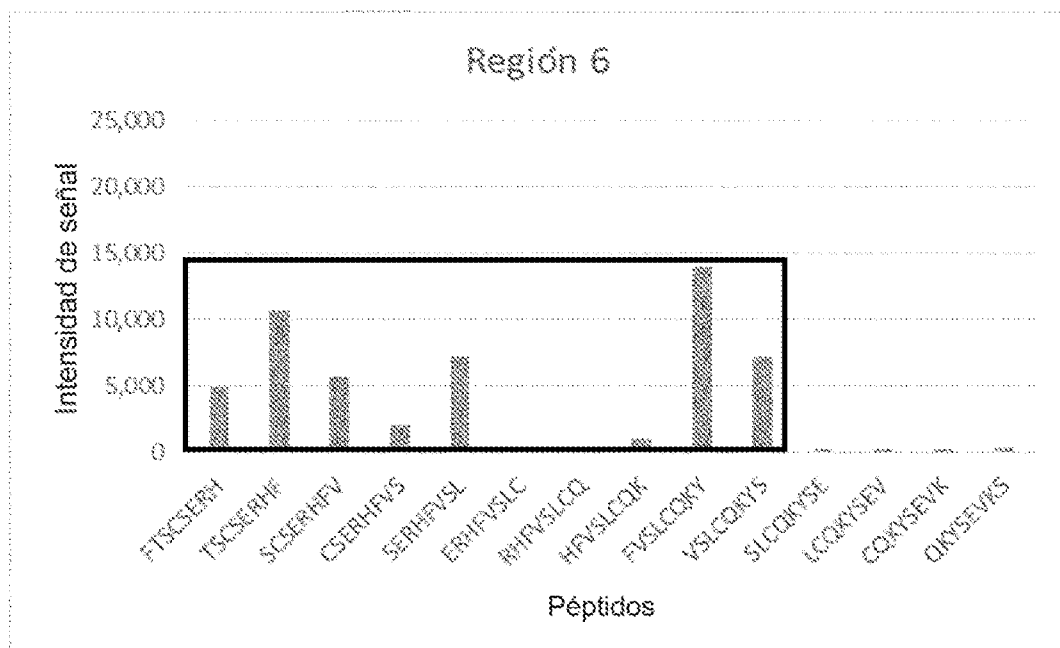
**Figura 6c**



**Figura 6d**

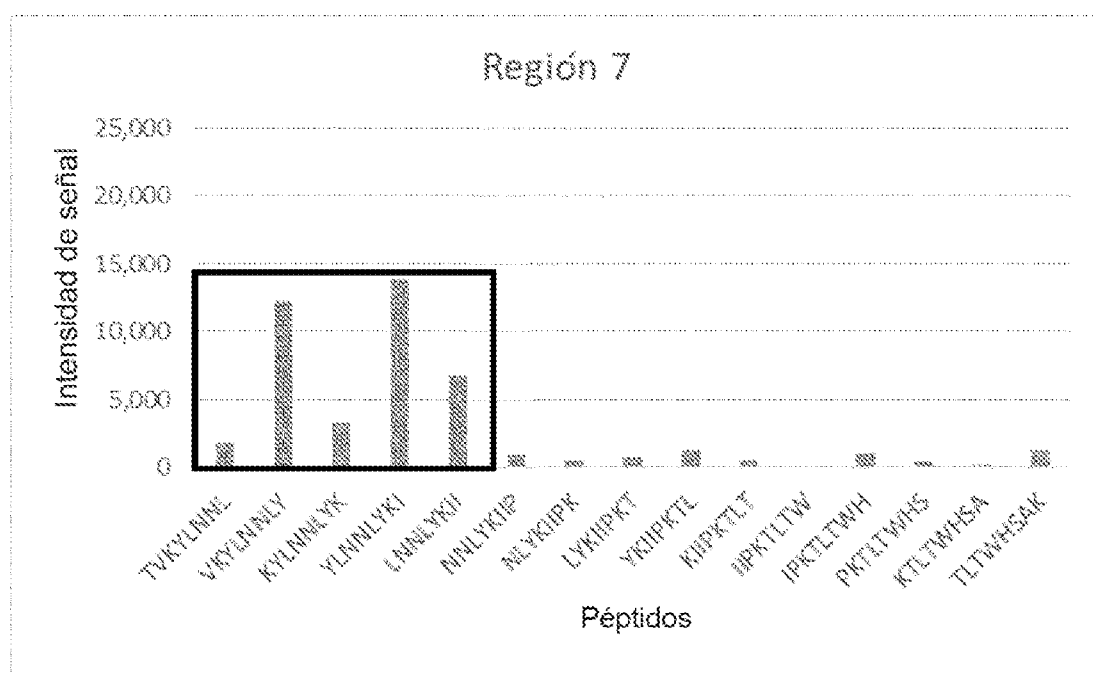


**Figura 6e**

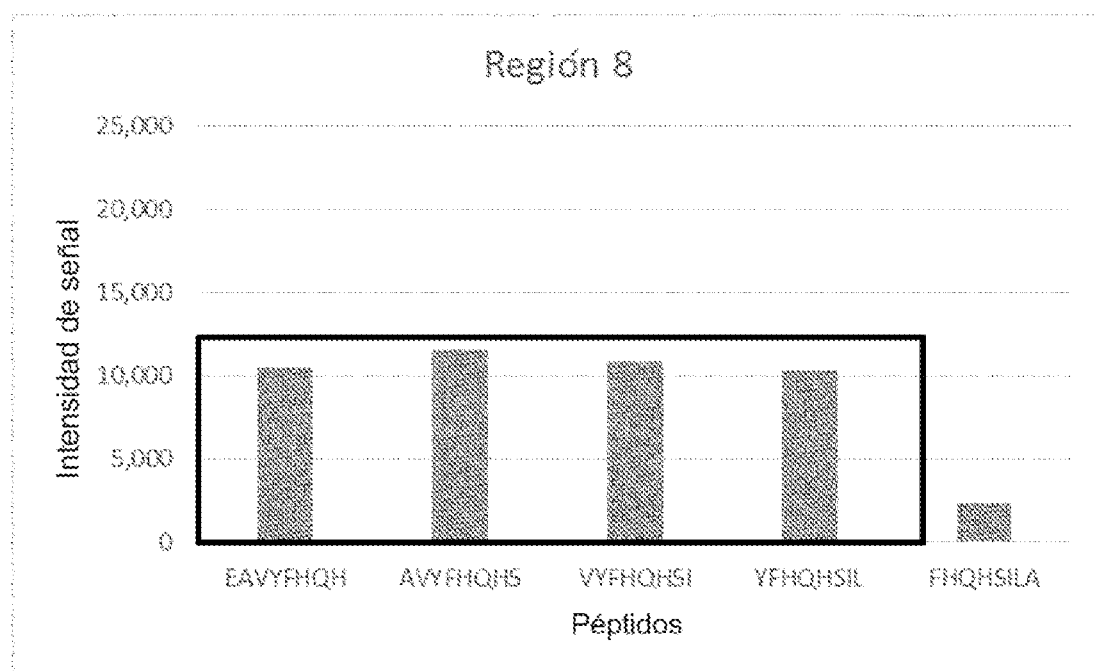


**Figura 6f**

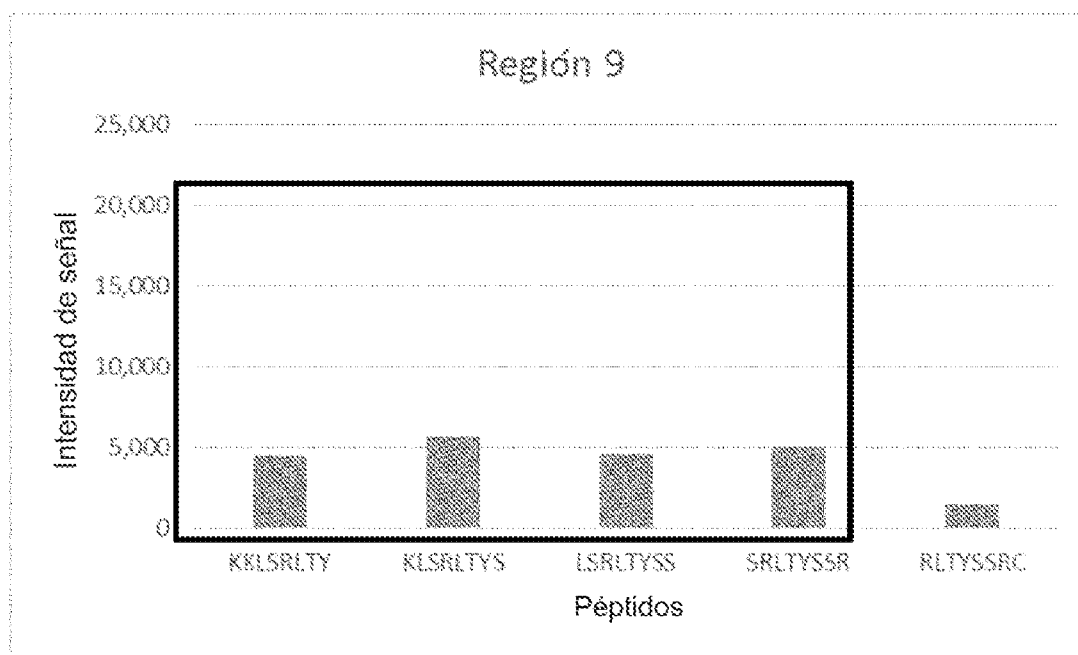




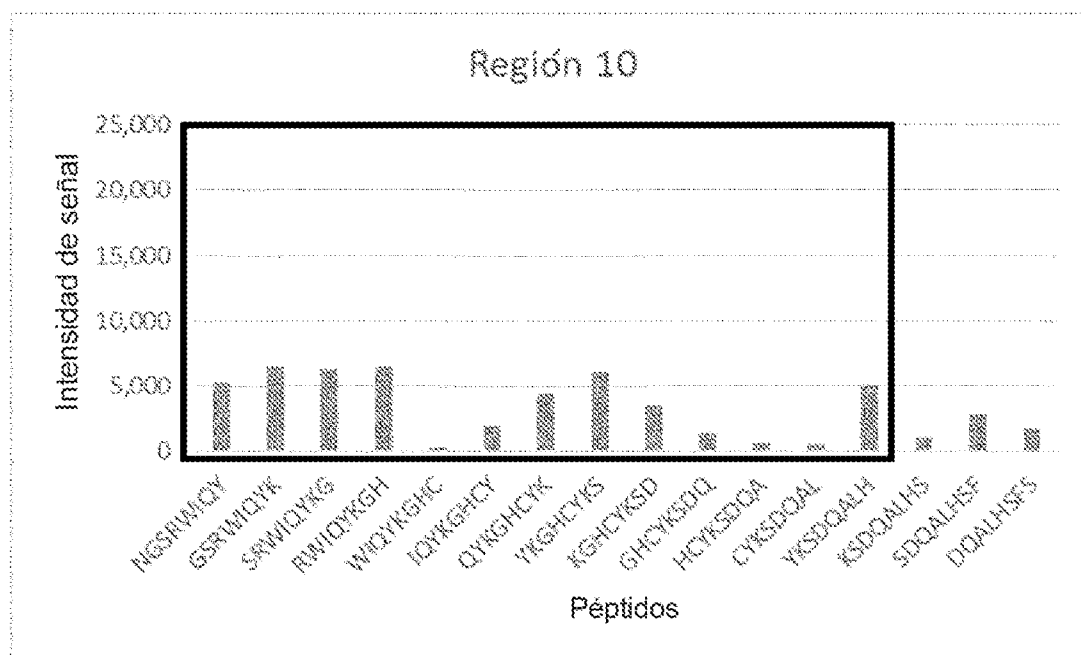
**Figura 6g**



**Figura 6h**



**Figura 6i**



**Figura 6j**

Figura 7

|                      |  |
|----------------------|--|
| sp O60449 LY75_HUMAN | MRTGWATERRPAGLIMLLFWPFDEAEPSGRAANDEFTIVHGNTGKCIKEVYGVIVADDCD 60    |
| MS-Péptidos_Elute1a  | -----CIKPVYGVIVADDCD   |
| MS-Péptidos_Elute1b  | -----CIKPVYGVIVADDCD   |
| MS-Péptidos_Elute2a  | -----  |
| MS-Péptidos_Elute2b  | -----  |
| LC-Péptidos          | -----  |
| sp O60449 LY75_HUMAN | ETEDKLVKVVQHRLEFHLHSQKCLGLDITKSVNELRMFSCDSSAMLVWKCEHHSLYGAAR 120   |
| MS-Péptidos_Elute1a  | ETEDKLVK-----CEHHSLYGAAR   |
| MS-Péptidos_Elute1b  | ETEDKLVK-----  |
| MS-Péptidos_Elute2a  | -----  |
| MS-Péptidos_Elute2b  | -----  |
| LC-Péptidos          | -----  |
| sp O60449 LY75_HUMAN | YRLALKDGHGTATSNASDVWKKGGSEESLCDQPYHEIYTRDGNVYGRPCBFPFLIDGTWH 180   |
| MS-Péptidos_Elute1a  | -----LGHGTAISNASDVWKKGGSEESLCDQPYHEIYTR-----                       |
| MS-Péptidos_Elute1b  | -----KGSEESLCDQPYHEIYTR-----                                       |
| MS-Péptidos_Elute2a  | -----GGSEESLCDQPYHEIYTR-----                                       |
| MS-Péptidos_Elute2b  | -----GGSEESLCDQPYHEIYTR-----                                       |
| LC-Péptidos          | -----LGHGTAISNASDVWK-----  |
| sp O60449 LY75_HUMAN | HDCILDEEHSGFWCATTILNYEYDRKWGICLKPENGCEDNWEKNEQFGSCVQFNTQTALSW 240  |
| MS-Péptidos_Elute1a  | -----WGICLKPENGCEDNWEK-----  |
| MS-Péptidos_Elute1b  | -----  |
| MS-Péptidos_Elute2a  | -----  |
| MS-Péptidos_Elute2b  | -----  |
| LC-Péptidos          | -----  |
| sp O60449 LY75_HUMAN | KEATVSCQNQGADHLSINSAAPLTLYLKKKEGLAKTEWIGLRLQLYSARGWESDHPKPLNEL 300 |
| MS-Péptidos_Elute1a  | -----IPWIGLNQLYSAR-----  |
| MS-Péptidos_Elute1b  | -----  |
| MS-Péptidos_Elute2a  | -----IPWIGLNQLYSAR-----  |
| MS-Péptidos_Elute2b  | -----  |
| LC-Péptidos          | -----  |
| sp O60449 LY75_HUMAN | NWDPRPSAPTIGGSSCARMDAESGLWQSFSCDAQLPYVCRKPLNNTVELTDVWTYSSTR 360    |
| MS-Péptidos_Elute1a  | -----  |
| MS-Péptidos_Elute1b  | -----  |
| MS-Péptidos_Elute2a  | -----  |
| MS-Péptidos_Elute2b  | -----  |
| LC-Péptidos          | -----  |
| sp O60449 LY75_HUMAN | QDAGWLPNNGPCYLLVRESNSWDKAAHAKCKAFSEDLSISRLADVEVVVTKLHNEDIKEE 420   |
| MS-Péptidos_Elute1a  | -----LHNEDIKEE   |
| MS-Péptidos_Elute1b  | -----LHNEDIKEE   |
| MS-Péptidos_Elute2a  | -----  |
| MS-Péptidos_Elute2b  | -----  |
| LC-Péptidos          | -----  |
| sp O60449 LY75_HUMAN | VWTGLKKNLIPTRFQWSDGHEVTLTYWDENEPNVDPYKRPNCVSYLGLGQWKVQSCBEK 480    |
| MS-Péptidos_Elute1a  | VWTGLK-----TPNCVSYLGLGQWK-----                                     |
| MS-Péptidos_Elute1b  | VWTGLK-----TPNCVSYLGLGQWK-----                                     |
| MS-Péptidos_Elute2a  | -----  |
| MS-Péptidos_Elute2b  | -----  |
| LC-Péptidos          | -----  |

```

sp|O60449|LY75_HUMAN      LRYVCKRKKGKELNDASSGKMCSPDEGSKRRHGGWCYKNEYDEVEFGSYNCHGTTTGRPRQRY 540
MS-Péptidos_Elute1a      -----
MS-Péptidos_Elute1b      -----
MS-Péptidos_Elute2a      -----
MS-Péptidos_Elute2b      -----
LC-Péptidos              -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      LNLMLKKYDKSLRKYFWTGLRQVDSGGEYNWATVGGRRRAVTFSSNWNFLSPASPGGQVAM 600
MS-Péptidos_Elute1a      -----YFWTGLRQVDSGGEYNWATVGGRR-----
MS-Péptidos_Elute1b      -----YFWTGLRQVDSGGEYNWATVGGRR-----
MS-Péptidos_Elute2a      -----YFWTGLRQVDSGGEYNWATVGGRR-----
MS-Péptidos_Elute2b      -----YFWTGLRQVDSGGEYNWATVGGRR-----
LC-Péptidos              -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      STGRSVGKWEVKDCRSFKALSLCKKMSGLGFEESAPKEDDQDPGQGEFFASLSQYKVF 660
MS-Péptidos_Elute1a      ----SVGKWEVKDCR---ALSLCKK-----
MS-Péptidos_Elute1b      -----
MS-Péptidos_Elute2a      -----
MS-Péptidos_Elute2b      -----
LC-Péptidos              ----WVVKDCRSFK-----FASLSQYKVF

sp|O60449|LY75_HUMAN      SAERIVRKRWEEAERFYQALGAHLSPFSRVDSIRKSLHFPLTDQPSGQHWLWIGLNKRSP 720
MS-Péptidos_Elute1a      -----RNWERARR-----RSP
MS-Péptidos_Elute1b      -----RNWERARR-----RSP
MS-Péptidos_Elute2a      -----
MS-Péptidos_Elute2b      -----
LC-Péptidos              RA-----

sp|O60449|LY75_HUMAN      DLQGSWLWSDRTFVSTIIMPNEFQQDYDIRDCAAVKVEHRAPWARGWHFYDDREFTYLRPF 780
MS-Péptidos_Elute1a      ----TTPVSTIIMPNEFQQDYDIR-----
MS-Péptidos_Elute1b      DLQGSWLWSDRTFVSTIIMPNEFQQDYDIR-----
MS-Péptidos_Elute2a      -----GWHFYDDR-----
MS-Péptidos_Elute2b      -----
LC-Péptidos              ----FWKRGWHFYDDRREFTYLRPF

sp|O60449|LY75_HUMAN      ACDTKLEWVQIQPKRTEKTPDWNYPDRAGIRGPPLIEGGEYWFVADLHENYEEAVLYC 840
MS-Péptidos_Elute1a      -----
MS-Péptidos_Elute1b      -----
MS-Péptidos_Elute2a      -----
MS-Péptidos_Elute2b      -----
LC-Péptidos              -----

sp|O60449|LY75_HUMAN      ASNHSFLATITISVGLKAIKKNKIANISGDCQKWWIRISEWPIEDHFTYSRYEWHREFVTF 900
MS-Péptidos_Elute1a      -----ISEWPIEDHFTYSR-----EPVTF
MS-Péptidos_Elute1b      -----ISEWPIEDHFTYSR-----
MS-Péptidos_Elute2a      -----
MS-Péptidos_Elute2b      -----
LC-Péptidos              -----EDHFTYSRYEWHREFVTF
                                *****

sp|O60449|LY75_HUMAN      GEECLYMSAKTWLIDLGKPTDCSTKLPICEKYNVSSLEKYSPDSAAKVQCSQWIPFQN 960
MS-Péptidos_Elute1a      GEECLYMSAKTWLIDLGKPTDCSTK-----YNVSSLEK-----VQCSQWIPFQN
MS-Péptidos_Elute1b      -----TWLIDLGKPTDCSTK-----YNVSSLEK-----VQCSQWIPFQN
MS-Péptidos_Elute2a      -----TWLIDLGKPTDCSTK-----
MS-Péptidos_Elute2b      -----TWLIDLGKPTDCSTK-----
LC-Péptidos              G-----

sp|O60449|LY75_HUMAN      KCPKIKIPVSLTFSCASDQCHSYGSTEPSVLSQTEQDFITSLPQMENTLWIGLRWTAYB 1020
MS-Péptidos_Elute1a      -----

```

```

MS-Péptidos_Elute1b -----
MS-Péptidos_Elute2a -----
MS-Péptidos_Elute2b -----
LC-Péptidos -----

sp|G60449|LY75_HUMAN KINKWTNNRELYSNFHEPLLVSGRLRIPENFEEESRYHCALILNLQKSPPTGTWNPTSC 1080
MS-Péptidos_Elute1a K-----ELITYSNFHEPLLVSGRLRIPENFEEESRYHCALILNLQK-----
MS-Péptidos_Elute1b K-----YHCALEENLQK-----
MS-Péptidos_Elute2a -----
MS-Péptidos_Elute2b -----
LC-Péptidos -----RELYSNFHEPL-----PTSC

sp|G60449|LY75_HUMAN SERHFFVSLQCKYSEVKSRLTLQNASETVKYLNNLYKIHPKTLTWHGAKRECLKSNMQLVS 1140
MS-Péptidos_Elute1a -----REVSLQCK-----QTQNASETVK-----TLTWHGAK-----
MS-Péptidos_Elute1b -----REVSLQCK-----QTQNASETVK-----TLTWHGAK-----
MS-Péptidos_Elute2a -----
MS-Péptidos_Elute2b -----
LC-Péptidos -----
SERHFFVSLQCKYS-----TVKYLNNLYKIH-----
*****

sp|G60449|LY75_HUMAN ITDPYQQAFLSVQALENNSEGLWGLEFSQDDELNFQWSDGKRLHFGRWAEENQQLSDGVVL 1200
MS-Péptidos_Elute1a -----
MS-Péptidos_Elute1b -----
MS-Péptidos_Elute2a -----
MS-Péptidos_Elute2b -----
LC-Péptidos -----

sp|G60449|LY75_HUMAN DTDGFNWKTVDDNDNQPGAICYSGNETEKEVKEVDSVKCFSPVLNTPWIPFQNCQYNFEL 1260
MS-Péptidos_Elute1a -----
MS-Péptidos_Elute1b -----
MS-Péptidos_Elute2a -----
MS-Péptidos_Elute2b -----
LC-Péptidos -----

sp|G60449|LY75_HUMAN TKNRMATTDQDSVHTKCKQLNPKSHILSIRGKKNNEFVLEQLLYFNMAQWVNLGETYRN 1320
MS-Péptidos_Elute1a -----SHILSIR-----
MS-Péptidos_Elute1b -----NRSMATTDQDSVHTK-----SHILSIR-----
MS-Péptidos_Elute2a -----
MS-Péptidos_Elute2b -----
LC-Péptidos -----

sp|G60449|LY75_HUMAN KSLMWFDKTPLSYTHWHAGRPETIANEXFLAGLSTDSFPWDIGQTEKVIIEAVYFHQHSILAC 1380
MS-Péptidos_Elute1a -----SLMWFDKTPLSYTHWH-----
MS-Péptidos_Elute1b -----SLMWFDK-----
MS-Péptidos_Elute2a -----SLMWFDK-----
MS-Péptidos_Elute2b -----
LC-Péptidos -----EAVYFHQHSIL-----

sp|G60449|LY75_HUMAN KIRWVDYKBEYNTTLRQPMFYEDGIYSVLIQKRVTWYBALNMCSDSGHLASVHNQNGQLF 1440
MS-Péptidos_Elute1a -----
MS-Péptidos_Elute1b -----
MS-Péptidos_Elute2a -----
MS-Péptidos_Elute2b -----
LC-Péptidos -----

sp|G60449|LY75_HUMAN LEDIVKRDGEFTLVVGLSDHDSGSESGEWSDSSTFDYLPWKQDTPGNCVLLDEKGTWKHE 1500
MS-Péptidos_Elute1a -----
MS-Péptidos_Elute1b -----
MS-Péptidos_Elute2a -----
MS-Péptidos_Elute2b -----
LC-Péptidos -----

```

```

sp|Q60449|LY75_HUMAN      KQNSVKDGAICYKEPTKSKKESRLTYSSRCFAAKENGSRWICQYKGHCYKSDQALHSFSEAK 1560
MS-Péptidos__Elute1a      -----
MS-Péptidos__Elute1b      -----
MS-Péptidos__Elute2a      -----
MS-Péptidos__Elute2b      -----
LC-Péptidos               -----KKLSRLTYSS-C-----NGSRWICQYKGHCYKSDQALH-----

sp|Q60449|LY75_HUMAN      KLCSEKHDHSATIVSIRDEEDENKQVSRRLMPENNNITMRVWLGLSQHSVDQ3WSWLDQSEVT 1620
MS-Péptidos__Elute1a      -----HDHSATIVSIKDEEDENKQVSR-----
MS-Péptidos__Elute1b      -----HDHSATIVSIKDEEDENKQVSR-----
MS-Péptidos__Elute2a      -----HDHSATIVSIKDEEDENKQVSR-----
MS-Péptidos__Elute2b      -----
LC-Péptidos               -----

sp|Q60449|LY75_HUMAN      FVKWENKSKSGVGRCSMLIASNETWKKVECEHGEGFRVVCCKVPLGFDYTAIAIIVATLSIL 1680
MS-Péptidos__Elute1a      -----VECEHGEGFR-----
MS-Péptidos__Elute1b      -----VECEHGEGFR-----
MS-Péptidos__Elute2a      -----
MS-Péptidos__Elute2b      -----
LC-Péptidos               -----

sp|Q60449|LY75_HUMAN      VLMGGELTWFLFQRHRLHLAGESSSVRYAQGVNEDSLMLPSEHD 1722
MS-Péptidos__Elute1a      -----
MS-Péptidos__Elute1b      -----
MS-Péptidos__Elute2a      -----
MS-Péptidos__Elute2b      -----
LC-Péptidos               -----

```

**Figura 8**

