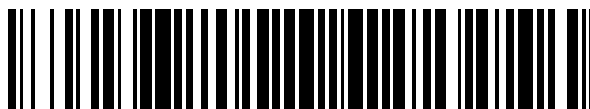


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 915**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2007** **PCT/US2007/086205**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2008** **WO08070593**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2007** **E 07868966 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **09.02.2022** **EP 2099823**

54 Título: **Agentes de unión a la diana variantes y usos de los mismos**

30 Prioridad:

01.12.2006 US 872239 P

16.03.2007 US 918563 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
26.05.2022

73 Titular/es:

SEAGEN INC. (100.0%)

21823 30th Drive, S.E.

Bothell, WA 98021, US

72 Inventor/es:

MCDONAGH, CHARLOTTE;

CARTER, PAUL y

SUSSMAN, DJANGO

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 523 915 T5

DESCRIPCIÓN

Agentes de unión a la diana variantes y usos de los mismos

5 Antecedentes de la invención

La conjugación de anticuerpos con fármacos citotóxicos es una de las maneras más prometedoras de mejorar la actividad terapéutica de los anticuerpos y reducir la toxicidad sistémica de los fármacos. Al menos seis conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) han avanzado en desarrollo clínico. Una característica de los anticuerpos que limita potencialmente el índice terapéutico (es decir, la dosis máxima tolerada/dosis mínima curativa) de un ADC es la toxicidad a las células no diana. Dicha especificidad puede ser específica o inespecífica. La captación no diana de los ADC puede conducir al catabolismo de los ADC, a la liberación del fármaco y/o a la toxicidad.

Por consiguiente, existe la necesidad de ADC y otros agentes de unión a la diana que puedan ejercer un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador clínicamente útil sobre las células diana, en particular, sin ejercer efectos no deseados sobre las células no diana. Dichos ADC y otros agentes de unión a la diana serían agentes terapéuticos útiles contra los cánceres que expresan un antígeno diana o los trastornos inmunológicos que expresan antígenos diana. La presente invención satisface esta y otras necesidades. (La mención de cualquier referencia en la presente solicitud no supone que la referencia sea de la técnica anterior a la presente solicitud).

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) variantes y agentes de unión a la diana variantes relacionados, así como métodos relacionados con el uso de dichos ADC y agentes de unión para la profilaxis o el tratamiento de cánceres y trastornos inmunológicos. Los ADC variantes y los agentes de unión a la diana variantes relacionados, solos o en combinación con un agente terapéutico, ejercen un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador sobre las células diana.

En un aspecto, la invención proporciona un agente de unión a la diana variante que comprende una región de unión que comprende una región Fv de anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno diana; una región Fc de una región constante de inmunoglobulina humana IgG1, comprendiendo la región Fc al menos una sustitución de un resto de aminoácido implicado en la interacción de unión de un receptor FcγRIIA con la región Fc; donde la al menos una sustitución comprende la introducción de un resto de cisteína en la posición de aminoácido 239 de la región Fc, es decir, S239C de acuerdo con el índice UE expuesto en Kabat; y un agente terapéutico que ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador conjugado directa o indirectamente con el resto de cisteína introducido; donde el agente de unión a la diana variante ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador sobre una célula que expresa el antígeno diana; y donde el agente de unión a la diana variante presenta una unión reducida a un receptor FcγRIIA. El agente de unión a la diana variante se une específicamente a un antígeno diana e incluye al menos una CDR o una región variable de un anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente de unión a la diana variante es un anticuerpo. El agente de unión a la diana variante incluye al menos una modificación (por ejemplo, la sustitución, adición o eliminación de un aminoácido) en o cerca de un dominio (por ejemplo, una región de un Fc, también denominada región Fc) que media en la unión de uno o más receptores Fcγ, generando una unión defectuosa con uno o más receptores Fcγ. El agente de unión a la diana variante puede presentar respuestas reducidas de los ADCC, ADCP y/o CDC. La al menos una modificación es el reemplazo de un resto de aminoácido que participa en la interacción de unión de la región Fc por uno o más receptores Fcγ por cisteína.

En otro aspecto, la invención proporciona el agente de unión a la diana variante para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa un antígeno diana en un sujeto. En general, el tratamiento incluye la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un agente de unión a la diana variante. El agente de unión a la diana variante se une específicamente a un antígeno diana e incluye al menos una CDR o una región variable de un anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente de unión a la diana variante es un anticuerpo. El agente de unión a la diana variante incluye al menos una modificación (por ejemplo, la sustitución, adición o eliminación de un aminoácido) en o cerca de un dominio (por ejemplo, una región de un Fc, también denominada región Fc) que media en la unión de uno o más receptores Fcγ, generando una unión defectuosa con uno o más receptores Fcγ. El agente de unión a la diana variante puede presentar respuestas reducidas de los ADCC, ADCP y/o CDC. La al menos una modificación es el reemplazo de un resto de aminoácido que participa en la interacción de unión de la región Fc por uno o más receptores Fcγ por cisteína.

La sustitución de aminoácidos afecta a la interacción de unión de la región Fc con el receptor FcγRIIA. La sustitución del aminoácido nativo con un resto de cisteína se introduce en la posición del aminoácido 239.

El agente de unión a la diana variante puede ser, por ejemplo, un anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente de unión a la diana (por ejemplo, anticuerpo) se une específicamente a CD20, CD30, CD33 o CD70. En algunas realizaciones, el anticuerpo variante compite por la unión a CD70 con el anticuerpo monoclonal 1F6 o 2F2. En otras

realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo 1F6 humanizado variante. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, monovalente, divalente o multivalente.

El cáncer puede ser, por ejemplo, un tumor de riñón, un linfoma de células B, un carcinoma de colon, la enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma no Hodgkin, un linfoma de células del manto, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, un carcinoma nasofaríngeo, tumor cerebral o un carcinoma tímico. El tumor renal puede ser, por ejemplo, un carcinoma de células renales. El tumor cerebral puede ser, por ejemplo, un glioma, un glioblastoma, un astrocitoma o un meningioma. El sujeto puede ser, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano.

También se describe el agente de unión a la diana variante para su uso en un método para tratar un trastorno inmunológico. El tratamiento incluye la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un agente de unión a la diana variante. El agente de unión a la diana variante se une específicamente a un antígeno diana en una célula inmune e incluye al menos una CDR o región variable de un anticuerpo. En algunas realizaciones, el agente de unión a la diana variante es un anticuerpo. El agente de unión a la diana variante incluye al menos una modificación (por ejemplo, una sustitución, adición o eliminación de un aminoácido) en o en la proximidad de un dominio (por ejemplo, una región Fc) que participa en la interacción de unión de la región Fc con uno o más receptores Fc γ , generando la unión defectuosa con uno o más receptores Fc γ . El agente de unión a la diana variante puede presentar respuestas reducidas de los ADCC, ADCP y/o CDC en el sujeto. La al menos una modificación es el reemplazo de un resto de aminoácido que participa en la interacción de unión de la región Fc por uno o más receptores Fc γ por cisteína.

El agente de unión a la diana variante puede ser, por ejemplo, un anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo incluye una región constante humana. En algunas realizaciones, el agente de unión a la diana (por ejemplo, anticuerpo) se une específicamente a CD19; CD20, CD30 o CD70. En algunas realizaciones, el agente de unión a la diana variante compite por la unión a CD70 con el anticuerpo monoclonal 1F6 o 2F2. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo 1F6 humanizado variante. El anticuerpo puede ser, por ejemplo, monovalente, divalente o multivalente.

El trastorno inmunológico puede ser, por ejemplo, un trastorno inmunológico mediado por linfocitos T. En algunas realizaciones, el trastorno inmunológico mediado por linfocitos T comprende linfocitos T activados. En algunas realizaciones, los linfocitos T activados expresan CD70. En algunas realizaciones, los linfocitos T en reposo no se agotan sustancialmente por la administración del agente de unión a la diana variante. El trastorno inmunológico mediado por linfocitos T también puede ser, por ejemplo, artritis reumatoide, artritis soriásica, lupus eritematoso sistémico (SLE), diabetes de tipo I, asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, púrpura trombocitopénica, esclerosis múltiple, soriasis, síndrome de Sjögren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis o enfermedad de injerto contra huésped. En otras realizaciones, el trastorno inmunológico es un trastorno de linfocitos B activados. El sujeto puede ser, por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano.

En un aspecto relacionado, también se proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de un cáncer o un trastorno inmunológico. La composición farmacéutica incluye un agente de unión a la diana variante o sal farmacéuticamente aceptable del mismo y al menos un ingrediente farmacéuticamente compatible. Además, se proporciona un kit farmacéutico que incluye un primer recipiente que comprende un agente de unión a la diana variante, donde el agente está liofilizado, y un segundo recipiente que comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable.

La presente invención se puede entender de manera más completa por referencia a la siguiente descripción detallada de la invención, a los ejemplos no limitantes de realizaciones específicas de la invención y a las figuras adjuntas y la lista de secuencias.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** es un diagrama esquemático que representa la interacción mediada por anticuerpos entre células efectoras y células diana (por ejemplo, células tumorales). Las células efectoras que portan receptores Fc γ , los receptores, bien Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIb (CD32b) o Fc γ RIIIa (CD16), se ponen muy próximas a las células tumorales a través de la unión del dominio Fc de los anticuerpos que se unen a los antígenos en la superficie de la célula tumoral. Fc γ RI induce la actividad de ADCC, Fc γ RIIb induce la actividad inhibidora y Fc γ RIIIa induce la actividad de ADCP, en las células tumorales dirigidas a anticuerpos. Fc γ RI, Fc γ RIIb y Fc γ RIIIa se expresan en una variedad de tejidos normales, leucocitos, todas las células de origen mieloide, células endoteliales y algunas células epiteliales.

La **Figura 2** muestra las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes humanos de los isotipos (A) IgG1 (SEC ID N°: 31), (B) IgG2 (SEC ID N°: 32), (C) IgG3 (SEC ID N°: 33) y (D) IgG4 (SEC ID N°: 34).

La **Figura 3** muestra las secuencias de aminoácidos de las variantes de los isotipos **(A)** IgG1 (SEC ID N°: 35); **(B)** IgG2 (SEC ID N°: 36) y **(C)** IgG4 (SEC ID N° 37) del derivado de anticuerpo 1F6 humanizado HJLA. La secuencia de aminoácidos de la IgG1 de h1F6 es la misma que la SEC ID N°: 16.

La **Figura 4** muestra las secuencias de aminoácidos de las variantes del dominio Fc **(A)** IgG1v1 (SEC ID N°: 38) y **(B)** IgG4v3 (SEC ID N°: 39) del derivado de anticuerpo 1F6 humanizado HJLA. **(A)** La IgG1v1 de h1F6 difiere de IgG1 de h1F6 en tres sustituciones de aminoácidos: E233P, L234V y L235A (sistema de numeración de Kabat), que corresponden a los aminoácidos 253-255, respectivamente (subrayados en la figura). **(B)** La IgG4v3 de h1F6 difiere de IgG4 de h1F6 en cuatro sustituciones de aminoácidos: S228P, L235A, G237A y E318A (numeración de Kabat), que corresponden a los aminoácidos 245, 252, 254 y 335, respectivamente (subrayados en la figura).

La **Figura 5** es un diagrama esquemático que representa la estructura de los anticuerpos anti-CD70 humanizado (h1F6) y h1F6 variante. G1, G2 y G4 indican anticuerpos que tienen las regiones constantes de los isotipos IgG1, IgG2 e IgG4, respectivamente. G1v1 indica la variante de IgG1 de h1F6, que tiene las sustituciones de aminoácidos E233P, L234V y L235A, que se traducen en alteraciones en la unión de Fc γ R. G4v3 indica la variante de IgG4 de h1F6, que tiene las sustituciones de aminoácidos S228P, L235A, G237A y E318A, que se traducen en alteraciones en la unión de Fc γ R.

La **Figura 6** muestra la afinidad de unión de los anticuerpos anti-CD70 humanizado (h1F6) y h1F6 variante con las células 786-O que expresan CD70. Se redujo cada anticuerpo (G1, G1v1, G2, G4 y G4v3 según lo indicado) y se marcó con maleimida C₅ Alexa Fluor 488 (AF488), y se incubaron diluciones en serie con células 786-O. Las células marcadas se detectaron usando un analizador de FACS LSRII, y los datos se analizaron usando una ecuación de modelo de unión de un sitio usando Prism v4.01. Los datos de afinidad de unión aparente indican que la modificación del isotipo IgG (G1, G2, G4) o la mutación de la estructura Fc (G1v1, G4v3) no afectan a la actividad de unión al antígeno.

La **Figura 7** muestra la expresión en la superficie celular de Fc γ RIIIa en células CHO transfectadas. Se analizaron por FACS la línea celular parental, CHO DG44, y dos líneas celulares transfectadas de forma estable con un vector de expresión de Fc γ RIIIa de longitud completa, 158F y 158V, usando un anticuerpo contra el Fc γ RIIIa humano conjugado con ficoeritrina (PE).

La **Figura 8** muestra la unión de anticuerpos anti-CD70 humanizados (h1F6) con células CHO que expresan el Fc γ RIIIa de longitud completa. Se incubaron la línea celular parental, CHO DG44, y dos líneas celulares transfectadas de forma estable con un vector de expresión de Fc γ RIIIa de longitud completa, 158F y 158V con anticuerpo h1F6 marcado con AF488. Las células marcadas se detectaron usando un analizador de FACS LSRII.

La **Figura 9** muestra la unión competitiva de los anticuerpos anti-CD70 humanizado (h1F6) y h1F6 variante con células CHO que expresan Fc γ RIIIa de longitud completa. Se aisló una línea celular CHO estable que expresaba Fc γ RIIIa humano de longitud completa, 158V, mediante clonación por dilución limitante y se combinó con diluciones en serie de las variantes de h1F6 o IgG1 de h1F6 parental en presencia de IgG1 de h1F6 marcada con Alexa Fluor 488 100 nM. Las células marcadas se detectaron usando un analizador de FACS LSRII. Las interacciones de unión de las variantes de h1F6 e IgG1 de h1F6 con células que expresan Fc γ RIIIa fueron comparables con los informes de la literatura. Solo IgG1 de h1F6 (triángulo abierto) interactuó significativamente con Fc γ RIIIa (panel izquierdo). La conjugación de IgG1 de h1F6 con el derivado de auristatina MMAF no afectó a la unión del anticuerpo con Fc γ RIIIa (panel derecho).

La **Figura 10** muestra la unión competitiva de los anticuerpos anti-CD70 humanizado (h1F6) y h1F6 variante con células CHO que expresan Fc γ RI de longitud completa. Se aisló una línea celular CHO estable que expresaba Fc γ RI humano de longitud completa mediante clonación por dilución limitante y se combinó con diluciones en serie de las variantes de h1F6 o IgG1 de h1F6 parental en presencia de IgG1 de h1F6 marcada con Alexa Fluor 488 50 nM. Las células marcadas se detectaron usando un analizador de FACS LSRII. Las interacciones de unión de las variantes de h1F6 o IgG1 de h1F6 con ambos Fc γ RI fueron comparables con los informes de la literatura. IgG1 de h1F6 (triángulo abierto) e IgG4 de h1F6 (triángulo abierto invertido) mostraron un patrón similar de unión de alta afinidad a Fc γ RI, mientras que no se observó interacción significativa con las otras variantes, IgG1v1 (diamante abierto), IgG2 (cuadrado abierto) e IgG4v3 (círculo abierto) (panel izquierdo). La conjugación de IgG1 de h1F6 o IgG4 de h1F6 con el derivado de auristatina MMAF (IgG1-F4 e IgG4-F4, respectivamente) no afectó a la unión de estos anticuerpos a Fc γ RI (panel derecho).

La **Figura 11** muestra la unión competitiva de anticuerpos h1F6 variantes con la introducción de la sustitución de cisteína, S239C, con células CHO que expresan Fc γ RIIIa de longitud completa (panel izquierdo) o Fc γ RI (panel derecho). Los ensayos se realizaron como se ha descrito anteriormente. La variante S239C de IgG1, bien sin conjugar o conjugada a vcMMAF (promedio de 2 fármacos/anticuerpo) presentó una unión reducida con las células que expresan Fc γ RIIIa, pero no con las células que expresan Fc γ RI. El control, el anticuerpo parental

h1F6, se une con las células que expresan FcγRIIIa y con las células que expresan FcγRI.

La **Figura 12** muestra la eficacia *in vivo* de los conjugados de fármaco y anticuerpos anti-CD70 humanizado (h1F6) y h1F6 variante en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de células renales 786-O. Los ratones desnudos, a quienes se inyectaron por vía subcutánea células de carcinoma de células renales 786-O, se trataron con una sola administración i.v. bien de 0,5 mg/kg (panel superior) o de 1,5 mg/kg (panel inferior) de conjugado de fármaco MMAF y anticuerpo h1F6 o h1F6 variante indicado una vez que el volumen medio del tumor hubo alcanzado 100 mm³. La administración se realizó en nueve (9) animales de cada grupo de tratamiento, y seis (6) animales recibieron solo vehículo. Los estudios de eficacia *in vivo* indicaron que: IgG1v1 de h1F6-vcMMAF4 (diamantes) tuvo una mayor eficacia que IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (triángulos); IgG2 de h1F6-vcMMAF4 (círculos) también tuvo una mayor eficacia que IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (triángulos); IgG4v3 de h1F6-vcMMAF4 (cuadrados) tuvo una eficacia equivalente a IgG4 de h1F6-vcMMAF4 (triángulos invertidos); e IgG1v1 de h1F6-vcMMAF4 (diamantes) tuvo una mejor eficacia que IgG4v3 de h1F6-vcMMAF4 (cuadrados).

La **Figura 13** muestra la eficacia *in vivo* de los conjugados de fármaco y anticuerpos anti-CD70 humanizado (h1F6) y h1F6 variante en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de células renales 786-O. Los ratones desnudos, a quienes se inyectaron por vía subcutánea células de carcinoma de células renales 786-O, se trataron con una sola administración i.v. bien de 0,5 mg/kg o de 1,5 mg/kg de conjugado de fármaco MMAF y anticuerpo h1F6 o h1F6 variante indicado una vez que el volumen medio del tumor hubo alcanzado 100 mm³. La administración se realizó en nueve (9) animales de cada grupo de tratamiento, y seis (6) animales recibieron solo vehículo. Los estudios de eficacia *in vivo* indicaron que: IgG1v1 de h1F6-vcMMAF4 (diamantes) tuvo una mayor eficacia que IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (cuadrados); IgG2 de h1F6-vcMMAF4 (círculos) también tuvo una mayor eficacia que IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (cuadrados); IgG4v3 de h1F6-vcMMAF4 (cruces) tuvo una eficacia equivalente a IgG4 de h1F6-vcMMAF4 (círculos); e IgG1v1 de h1F6-vcMMAF4 (diamantes) tuvo una mejor eficacia que IgG4v3 de h1F6-vcMMAF4 (cruces).

La **Figura 14** muestra la eficacia *in vivo* del conjugado de fármaco y anticuerpo anti-CD70 humanizado (h1F6) en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de células renales 786-O. Los ratones desnudos, que recibieron por inyección subcutánea células de carcinoma de células renales 786-O, se trataron con una sola administración i.v. bien de 1,5 mg/kg o de 4,5 mg/kg de cada conjugado de variante de h1F6-fármaco mcMMAF una vez que el volumen medio del tumor hubo alcanzado 100 mm³. Los estudios de eficacia *in vivo* indicaron que: IgG1v1 de h1F6-mcMMAF4 (diamantes) tuvo una mayor eficacia que IgG1 de h1F6-mcMMAF4 (triángulos); IgG2 de h1F6-vcMMAF4 (cuadrados) también tuvo una mayor eficacia que IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (triángulos).

La **Figura 15** muestra la eficacia *in vivo* de los conjugados de fármaco y anticuerpo anti-CD70 humanizado (h1F6) en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de células renales UMRC-3. Los ratones desnudos, que recibieron por inyección subcutánea células de carcinoma de células renales UMRC-3, se trataron con una administración i.v. q4dx4 de vehículo (no tratado), 10 mg/kg de anticuerpo h1F6, 3 mg/kg de conjugado de anticuerpo h1F6-fármaco MMAF h1F6-vcMMAF4, 10 mg/kg de conjugado de anticuerpo h1F6-fármaco MMAF h1F6-mcMMAF o 3 mg/kg de conjugado de anticuerpo control-fármaco MMAF cAC10-vcMMAF una vez que el volumen medio del tumor hubo alcanzado 100 mm³. La administración se realizó en nueve (9) animales de cada grupo de tratamiento, y seis (6) animales recibieron solo vehículo. Los estudios de eficacia *in vivo* indicaron que; h1F6-vcMMAF4 (cuadrados azules) y h1F6-mcMMAF (cuadrados rojos) tuvieron eficacia en comparación con h1F6 sin conjugar (cuadrados abiertos) o un conjugado de anticuerpo cAC10 control y fármaco MMAF (triángulos).

La **Figura 16** muestra la eficacia *in vivo* de los conjugados de fármaco y anticuerpo anti-CD70 humanizado (h1F6) y las variantes en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de células renales UMRC-3. Los ratones desnudos recibieron por inyección subcutánea células de carcinoma de células renales UMRC-3. El tratamiento con las cantidades indicadas de anticuerpo se inició cuando el volumen del tumor hubo alcanzado aproximadamente 100 mm³. En referencia al panel A, los animales recibieron i.v. q4dx4 control sin anticuerpo (sin tratar), 1 mg/kg o 3 mg/kg de 1F6vcMMAF4, IF6G1v1vcMMAF4, 1F6G2vcMMAF4, 1F6G4vcMMAF4 o 1F6G4v3vcMMAF4. El punto final medido del estudio fue el volumen del tumor. Haciendo referencia al panel b, los animales recibieron i.v. q4dx4 control sin anticuerpo (sin tratar), 3 mg/kg o 6 mg/kg de 1F6vcMMAF4, IF6G1v1vcMMAF4, 1F6G2vcMMAF4, 1F6G4vcMMAF4 o 1F6G4v3vcMMAF4. El punto final medido del estudio fue el volumen del tumor.

La **Figura 17** muestra la farmacocinética *in vivo* de los conjugados de fármaco y anticuerpos anti-CD70 humanizado (h1F6) y h1F6 variante. Los ratones se trataron como se ha descrito en la Figura 11. Se extrajo sangre de tres (3) ratones tratados con la dosis de 1,5 mg/kg de cada conjugado de fármaco MMAF y anticuerpo h1F6 y h1F6 variante 1 hora, 1 d, 7 d y 14 d después de la administración del fármaco. Se midieron las concentraciones en suero de los conjugados de fármaco y anticuerpo en estos puntos temporales usando un ELISA de unión a anti-idiotipo. IgG1v1 de h1F6-vcMMAF4 (triángulos) e IgG2 de h1F6-vcMMAF4 (triángulos invertidos) se eliminaron más lentamente de la circulación en comparación con IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (cuadrados). IgG4 de h1F6-vcMMAF4 (diamantes) e IgG4v3 de h1F6-vcMMAF4 (círculos) se eliminaron más

lentamente de la circulación en comparación con IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (cuadrados).

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención proporciona agentes de unión a la diana variantes. También se describen métodos de uso de dichos agentes de unión para la profilaxis o el tratamiento de cánceres y trastornos inmunológicos. Los agentes de unión a la diana variantes incluyen una región de unión que se une específicamente a un antígeno diana (por ejemplo, el dominio extracelular de la molécula diana). Los agentes de unión a la diana variantes incluyen al menos una modificación (por ejemplo, sustitución, adición o eliminación de un aminoácido) en o en la proximidad de un dominio (por ejemplo, una región Fc) que participa en la interacción de unión de la región Fc con uno o más receptores Fc γ , generando un deterioro de la unión al/a los receptor/es Fc γ (normalmente, un receptor Fc γ humano). Sorprendentemente, los agentes de unión a la diana variantes con una alteración de la unión al/a los receptor/es Fc γ presentan una mayor potencia contra las células diana, en comparación con el agente de unión no variante comparable. El agente de unión a la diana variante también puede proporcionar una mayor exposición *in vivo*, en comparación con el agente de unión no variante (por ejemplo, una mayor AUC). También se contempla que dichos agentes de unión a la diana variantes presentarán toxicidad reducida a las no dianas, en comparación con sus precursores no variantes. El agente de unión a la diana variante normalmente tiene una función de ADCC, ADCP y/o CDC reducida o ausente. El agente de unión a la diana variante puede ejercer un efecto citostático, citotóxico o inmunomodulador.

20 En un aspecto, las composiciones se refieren a agentes de unión a la diana variantes tales como anticuerpos y derivados de anticuerpos. Los agentes de unión a la diana variantes incluyen una región o un dominio constante de anticuerpo. La región o el dominio constante de anticuerpo son del subtipo IgG. La región o el dominio constante de anticuerpo tienen un dominio (por ejemplo, una región Fc) que puede interactuar con las células efectoras o complemento para mediar en un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador que genere el agotamiento o la inhibición de la proliferación de células que expresan la diana. La región Fc tiene al menos una modificación (por ejemplo, sustitución, adición o eliminación de un aminoácido) de manera que la unión a uno o más receptores Fc γ se deteriora y se reducen una o más funciones efectoras (por ejemplo, a respuesta de ADCC, ADCP y/o CDC). La al menos una modificación es el reemplazo de un resto de aminoácido que participa en la interacción de unión de la región Fc por uno o más receptores Fc γ por cisteína. También se describe el reemplazo de tres restos de aminoácidos contiguos que participan en la interacción de unión de la región Fc con uno o más receptores Fc γ por asparagina-X-serina o asparagina-X-treonina, donde X no es prolina. El agente de unión a la diana variante puede ser un anticuerpo monoclonal, quimérico o humanizado, o un fragmento o derivado del mismo. En un ejemplo de realización, el anticuerpo variante, fragmento o derivado del mismo, compete con el anticuerpo monoclonal murino (mAb) 1F6 o 2F2 por la unión a CD70 y comprende secuencias de la región constante de anticuerpos humanos.

La sustitución del aminoácido afecta a la interacción de unión de la región Fc con el receptor Fc γ RIIIa. La sustitución del aminoácido nativo con un resto de cisteína se introduce en la posición del aminoácido 239.

40 En una realización ilustrativa, el agente de unión a la diana variante tiene una unión o captación reducida por las células no diana. Por ejemplo, la unión o la captación por las células no diana se puede reducir en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 %, en comparación con un agente de unión a diana no variante. En otra realización ilustrativa, el agente de unión a la diana variante presenta una unión reducida con uno o más receptores Fc γ , pero conserva la capacidad de unirse a los receptores FcRn. En una realización ilustrativa, el agente de unión a la diana variante ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador.

50 En algunas realizaciones, el nivel de suero de sangre del agente de unión a la diana variante se aumenta con respecto a un agente de unión a la diana no variante. Por ejemplo, el nivel de suero en sangre del agente de unión a la diana variante se puede aumentar en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 %, con respecto a un agente de unión a la diana no variante.

55 En algunas realizaciones, la semivida en suero sanguíneo del agente de unión a la diana variante se aumenta con respecto a un agente de unión a la diana no variante. Por ejemplo, la semivida en suero sanguíneo del agente de unión variante se puede aumentar en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % con respecto a un agente de unión a la diana no variante.

60 En algunas realizaciones, la potencia del agente de unión a la diana variante se aumenta con respecto a un agente de unión a la diana no variante. Por ejemplo, la potencia del agente de unión a la diana variante se puede aumentar en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % con respecto a un agente de unión a la diana no variante.

65 También se incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden un agente de unión a la diana variante y un

ingrediente farmacéuticamente compatible (por ejemplo, vehículo o excipiente).

También se incluyen los kits y artículos de fabricación que comprenden un agente de unión a la diana variante.

- 5 Para mayor claridad de la divulgación, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en los siguientes apartados.

1. Definiciones y abreviaturas

- 10 A menos que se defina lo contrario, todas las expresiones y los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto habitual en la materia pertinente a los métodos y las composiciones descritos. Cuando, en el presente documento, se usan denominaciones comerciales, los solicitantes pretenden incluir de forma independiente la formulación del producto de la denominación comercial, el fármaco genérico y el/los principio/s farmacéutico/s activo/s del producto de la denominación comercial. Como se
15 usan en el presente documento, los siguientes términos y las siguientes expresiones tendrán el significado que se les atribuye, a menos que se especifique lo contrario.

- Las expresiones "agente de unión a la diana" y "agente de unión anti-diana", como se usan en el presente documento, significan un anticuerpo, o un derivado o un fragmento de un anticuerpo, u otro agente que se une a un
20 antígeno diana y comprende al menos una porción de una región Fc. La expresión "agente de unión a la diana" también incluye un anticuerpo, o un derivado o un fragmento de un anticuerpo, u otro agente que se une a un antígeno diana y comprende al menos una porción de una región Fc conjugada con un agente terapéutico que ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador. En algunas realizaciones, el agente de unión a la diana comprende además al menos una región CDR o región variable de un anticuerpo, o un derivado del mismo, que se
25 une al antígeno diana. La expresión "agente de unión a la diana" incluye "agente de unión a la diana variante" definido más adelante.

- La expresión "conjugado de anticuerpo y fármaco" o "ADC", como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo, o un derivado o un fragmento de un anticuerpo, u otro agente que se une a un antígeno diana y
30 comprende al menos una porción de una región Fc conjugado con un agente terapéutico que ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador.

- El término "variante" como se usa en el presente documento significa un agente de unión a la diana, tal como un anticuerpo, o un derivado o un fragmento de un agente de unión a la diana, que incluye al menos una modificación
35 (por ejemplo, sustitución, adición o eliminación de aminoácido) en un dominio (por ejemplo, una región Fc) que participa en la interacción de la región Fc con uno o más receptores Fc γ , generando una unión defectuosa con uno o más receptores Fc γ . El agente de unión a la diana variante puede presentar respuestas ADCC, ADCP y/o CDC reducidas o ausentes. El término "variante" también incluye un agente de unión a la diana, o un derivado o un fragmento de un agente de unión a la diana, que incluye un dominio (por ejemplo, una región Fc) de un dominio
40 constante de un isotipo IgG distinto de IgG1 (por ejemplo, IgG2, IgG3 o IgG4).

- La expresión "región Fc" o "dominio Fc" se refiere a la/s región/es de una región constante de anticuerpo (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que participa/n en la interacción de unión de la región Fc con uno o más
45 receptores Fc γ (por ejemplo, Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIb (CD32b) o Fc γ RIIIa (CD16). Las ubicaciones de las regiones o los dominios de las regiones constantes de los isotipos IgG se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604, y Canfield y Morrison, 1991, *J. Exp. Med.* 173:1483-1491 y Sondermann *et al.*, 2000, *Nature* 406(6793): 267-73. Las regiones o los dominios Fc incluyen, por ejemplo y sin limitación, la región bisagra y el dominio C_H2.

- La expresión "unión defectuosa con uno o más receptores Fc γ " o "unión defectuosa con un receptor Fc γ " se refiere a la reducción de la capacidad de un agente de unión a la diana variante para unirse a una receptor Fc γ en
50 comparación con un agente de unión a la diana no variante. En algunas realizaciones, la unión del agente de unión a la diana variante con un receptor Fc γ se reduce en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 %, con respecto a un agente de unión
55 a la diana no variante.

- Las expresiones "que se une específicamente" y "unión específica" significan que el agente de unión reaccionará, de una manera muy selectiva, con su correspondiente antígeno (por ejemplo, CD70), y no con la multitud de otros
60 antígenos (por ejemplo, moléculas distintas de CD70).

- Como se usa en el presente documento, el término "funcional" en el contexto de un agente de unión a la diana indica que el agente de unión es capaz de unirse específicamente a un antígeno diana.

- El término "inhibir" y la expresión "inhibición de", como se usan en el presente documento, significan reducir en una
65 cantidad medible o evitar por completo.

El término "agotarse", en el contexto del efecto de un agente de unión a una diana sobre las células que expresan la diana, se refiere a una reducción del número de o la eliminación de las células que expresan la diana.

Las expresiones "anticuerpos intactos" e "inmunoglobulinas intactas" se definen en el presente documento como glucoproteínas heterotetraméricas, normalmente de aproximadamente 150.000 Daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida covalentemente a una cadena pesada por un enlace disulfuro para formar un heterodímero. El heterotetrámero se forma mediante enlace disulfuro covalente entre las dos cadenas pesadas idénticas de dichos heterodímeros. Aunque las cadenas ligeras y pesadas están unidas entre sí por un enlace disulfuro, el número de enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas varía según el isotipo de la inmunoglobulina (Ig). Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios distanciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en el extremo amino-terminal un dominio variable (V_H), seguido de tres o cuatro dominios constantes (C_H1 , C_H2 , C_H3 y/o C_H4), así como una región bisagra (J) entre C_H1 y C_H2 . Cada cadena ligera tiene dos dominios, un dominio variable amino-terminal (V_L) y un dominio constante carboxi-terminal (C_L). El dominio V_L se asocia no covalentemente con el dominio V_H , mientras que el dominio C_L normalmente está ligado covalentemente con el dominio C_H1 a través de un enlace disulfuro. Se cree que determinados restos de aminoácidos forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y pesada (Chothia *et al.*, 1985, *J. Mol. Biol.* 186: 651-663).

El término "hipervariable" se refiere a ciertas secuencias dentro de los dominios variables que difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y contienen restos que están implicados directamente en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular con su determinante antigénico específico. La hipervariabilidad en los dominios variables tanto de cadena ligera como de cadena pesada se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o bucles hipervariables (HVL). Las CDR se definen mediante la comparación de secuencias en Kabat *et al.*, 1991, En: "Sequences of Proteins of Immunological Interest", V ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, M. D., mientras las HVL se definen estructuralmente de acuerdo con la estructura tridimensional del dominio variable, según lo descrito por Chothia y Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917. Cuando estos dos métodos dan lugar a identificaciones ligeramente diferentes de una CDR, se prefiere la definición estructural. Según lo definido por Kabat (véase Kabat *et al.*, "Sequences of proteins of immunological interest", V ed., N° de publicación 91-3242, Departamento estadounidense de sanidad y asuntos sociales, NIH, Bethesda, M. D., 1991), la CDR-L1 se sitúa aproximadamente en los restos 24-34, CDR-L2, aproximadamente en los restos 50-56 y CDR-L3 aproximadamente en los restos 89-97 del dominio variable de cadena ligera; y CDR-H1 en aproximadamente 31-35, CDR-H2 en aproximadamente 50-65 y CDR-H3 en aproximadamente 95-102 del dominio variable de cadena pesada.

Las tres CDR de cada una de las cadenas pesada y ligera están separadas por regiones marco (FR), que contienen secuencias que tienden a ser menos variables. Del extremo amino al extremo carboxi de los dominios variables de cadena pesada y ligera, las FR y CDR se disponen en el orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Gran parte de la configuración de lámina β de las FR lleva a las CDR de cada una de las cadenas a estar muy próximas entre sí, así como a las CDR de la otra cadena. La configuración resultante contribuye al sitio de unión al antígeno (véase Kabat *et al.*, 1991, N° de publicación del NIH: 91-3242, Vol. I, páginas 647-669), aunque no todos los restos de las CDR participan necesariamente de manera directa en la unión al antígeno.

Los restos de FR y los dominios constantes de Ig normalmente no participan directamente en la unión al antígeno, pero pueden contribuir a la unión al antígeno o mediar en la función efectora del anticuerpo. Algunos restos de FR pueden tener un efecto significativo sobre la unión al antígeno en al menos tres formas: 1) mediante la unión no covalente directamente a un epítipo; 2) mediante la interacción con uno o más restos de las CDR; y 3) afectando la superficie de contacto entre las cadenas pesadas y ligeras. Los dominios constantes median en diversas funciones efectoras de las Ig, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC), la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o la fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP).

Las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas de vertebrados se asignan a una de dos clases claramente distintas, kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencia de aminoácidos del dominio constante. A modo comparativo, las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas de mamíferos se asignan a una de las cinco clases principales, de acuerdo con la secuencia de los dominios constantes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Las IgG e IgA se dividen además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las clases de inmunoglobulinas nativas son muy conocidas.

El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca específicamente los anticuerpos nativos y de longitud completa, los anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y los fragmentos de unión al antígeno o al anticuerpo de los mismos, tales como dominios variables y otras porciones de anticuerpos que presentan una actividad biológica deseada, por ejemplo, la unión a un antígeno diana.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea; es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único determinante antigénico, también denominado epítipo. El adjetivo "monoclonal" indica una población sustancialmente homogénea de anticuerpos dirigidos al epítipo idéntico y no debe interpretarse como que se requiere la producción del anticuerpo mediante algún procedimiento en particular. Los anticuerpos monoclonales se pueden crear mediante cualquier técnica o metodología conocida en la técnica; por ejemplo, el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Köhler *et al.*, 1975, *Nature* 256:495, o métodos de ADN recombinante conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 4.816.567). En otro ejemplo, los anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos, usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, 1991, *Nature* 352: 624-628, y Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-597.

Por el contrario, los anticuerpos de una preparación de anticuerpos policlonales son normalmente una población heterogénea de isotipos y/o clases de inmunoglobulinas, y también presentan una variedad de especificidad epitópica.

La expresión "anticuerpo quimérico", como se usa en el presente documento, es un tipo de anticuerpo monoclonal en el que una parte o la secuencia completa de aminoácidos en una o más regiones o dominios de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a, o un derivado de la secuencia correspondiente en un anticuerpo monoclonal de otra especie o perteneciente a otra clase o isotipo de inmunoglobulina, o de una secuencia de consenso. Los anticuerpos quiméricos incluyen fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que el fragmento de anticuerpo presente la actividad biológica deseada de su anticuerpo parental, por la unión al mismo epítipo (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.816.567 ejemplo; y Morrison *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81:6851-6.855). Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Morrison, 1985. *Science* 229:1202; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4:214; Gillies *et al.*, 1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202; patentes de EE.UU. N° 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397).

La expresión "fragmento de anticuerpo" referida a una porción de un anticuerpo de longitud completa donde se conserva una región variable o una capacidad funcional, por ejemplo, la unión a un epítipo específico. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, un fragmento Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, scFv y scFv-Fc, diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo, anticuerpo lineal, anticuerpo de cadena única y otros anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. (Véase Holliger y Hudson, 2005, *Nat. Biotechnol* 23: 1126-1136).

Un fragmento de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" es un derivado de Fv de cadena sencilla que comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, donde los dominios están presentes en una sola cadena polipeptídica y que es capaz de reconocer y unirse al antígeno. El polipéptido scFv contiene opcionalmente un polipéptido enlazador situado entre los dominios V_H y V_L que permite al scFv formar una estructura tridimensional deseada para la unión al antígeno (véase, por ejemplo, Pluckthun, 1994, en "The Pharmacology of Monoclonal Antibodies", Vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315).

El término "diacuerpo" se refiere a un fragmento de anticuerpo pequeño que tiene dos sitios de unión al antígeno. Cada fragmento contiene un dominio variable de cadena pesada (V_H) concatenado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) para formar un polipéptido V_H-V_L o V_L-V_H. Mediante el uso de un enlazador que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios V_H-V_L ligados son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena, creando dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen de manera más completa, por ejemplo, en el documento EP 404097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 6444- 6448.

La expresión "anticuerpo lineal" se refiere a anticuerpos que comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V_H-C_H1-V_H-C_H1) que forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos, como se describe en Zapata *et al.*, 1995, *Protein Eng.* 8 (10): 1057-1062.

Un "anticuerpo humanizado" se refiere a un derivado de una secuencia de aminoácidos de inmunoglobulina o fragmento del mismo que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una cadena de polipéptido de la región variable que tiene regiones marco que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una o varias CDR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana.

En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácido introducidos en el mismo de una fuente que no es humana. Dichos restos de aminoácido no humanos se denominan en el presente documento restos "importados", que normalmente se toman de un dominio de anticuerpo "importado", en particular, de un dominio variable. Un resto, una secuencia o un anticuerpo importado tienen una afinidad y/o especificidad deseada, u otra actividad biológica del anticuerpo deseable como se ha descrito en el presente documento.

- En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia de inmunoglobulina humana, tales como, por ejemplo, una secuencia de consenso o línea germinal. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de un dominio Fc de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana. Por ejemplo, el anticuerpo puede contener tanto la cadena ligera, como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones C_H1, bisagra (J), C_H2, C_H3 y/o C_H4 de la cadena pesada, según sea apropiado.
- El anticuerpo humanizado es IgG1. La región o el dominio constante pueden incluir, por ejemplo, un dominio constante de fijación de complemento, donde se desee que el anticuerpo humanizado presente actividad citotóxica (por ejemplo, IgG1).
- No es necesario que las regiones FR y CDR del anticuerpo humanizado correspondan exactamente a las secuencias parentales, por ejemplo, se pueden modificar la CDR importada o la FR de consenso mediante la sustitución, inserción o eliminación de al menos un resto de modo que el resto de CDR o FR en ese sitio no corresponda bien al anticuerpo de consenso o al anticuerpo de importación. Dichas mutaciones normalmente no serán extensas. Por lo general, al menos el 75 % de los restos del anticuerpo humanizado corresponderá a los de las secuencias de FR y CDR parentales, más a menudo al menos el 90 %, y más a menudo más del 95 %.
- La expresión "célula inmune", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula de linaje hematopoyético que participa en la regulación de una respuesta inmune. En realizaciones típicas, una célula inmune es un linfocito T, un linfocito B, una célula NK, un monocito/macrófago o una célula dendrítica.
- La expresión "célula efectora", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula que expresa un receptor de superficie para el dominio Fc de una inmunoglobulina (FcR). Por ejemplo, las células que expresan el FcR de superficie para las IgG incluyendo FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD64) pueden actuar como células efectoras. Dichas células efectoras incluyen monocitos, macrófagos, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y eosinófilos.
- Un "agente terapéutico" es un agente que ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador sobre las células cancerosas, las células inmunitarias activadas u otra población de células diana. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, agentes citostáticos y agentes inmunomoduladores.
- Un "efecto citotóxico" se refiere al agotamiento, la eliminación y/o la muerte de una célula diana. Un "agente citotóxico" se refiere a un agente que tiene un efecto citotóxico sobre una célula. La expresión pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰ y Re¹⁸⁶), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, y fragmentos de las mismas. Dichos agentes citotóxicos se pueden acoplar a un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo, y usarse, por ejemplo, para tratar a un paciente indicado para la terapia con el anticuerpo. En una realización, "agente citotóxico" incluye anticuerpos monoclonales, por ejemplo, los anticuerpos usados en combinación con los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento.
- Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como una tiotepa y ciclofosfamida (CytoxanTM); sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenemelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente, bullatacina y bullatacinona); camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina) y derivados de los mismos; criptoficinas (particularmente, criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina, auristatinas (incluyendo análogos monometil-auristatina E y monometil-auristatina F (véase, por ejemplo, la solicitud publicada de EE.UU. N° 2005-0238649, publicada el 27 de octubre de 2005, incorporada en el presente documento en su totalidad); duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; sarcodictina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucil, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina; trofosfamida; mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediina (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina γ11 y caliqueamicina phil1, véase, por ejemplo, Agnew, *Chem. Intl. Ed. Engl.* 33: 183-186; dinemicina, incluyendo dinemicina A; bisfosfonatos tales como clodronato; esperamicina; así como cromóforo neocarzinostatina y cromóforos antibióticos de cromoproteína enedina relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (AdriamycinTM) (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina,

rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, testolactona; antipararrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico tal como ácido folínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamidato; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucil; bisantreno; edatraxato; defofamina; democolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglucid; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona, mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK[®]; razoxano; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitabronitol; mitolactol; pipobromán; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamidato; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (Taxol[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y docetaxel (Taxotere[®], Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina (Gemzar[™]); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamidato; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina (Navelbine[™]); novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en la presente definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como antiestrógenos y moduladores selectivos del receptor estrogénico (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo Nolvadex[™]), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston[™]); inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (Megace[™]), exemestano, formestano, fadrozol, vorozol (Rivisor[™]), letrozol (Femara[™]) y anastrozol (Arimidex[™]); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

El término "profármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales que el fármaco original, y es capaz de ser activado enzimáticamente o convertido en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, 1986, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", en *Biochemical Society Transactions*, 14, pág. 375-382, 615 encuentro de Belfast; y Stella *et al.*, 1985, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", en: "Directed Drug Delivery", Borchardt *et al.*, (ed.), pág. 247-267, Humana Press. Los profármacos útiles incluyen, pero sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glucosilados, profármacos que contienen β-lactamas, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida, profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco incluyen, pero sin limitación, los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Un "efecto citostático" se refiere a la inhibición de la proliferación celular. Un "agente citostático" se refiere a un agente que tiene un efecto citostático sobre una célula, inhibiendo de este modo el crecimiento y/o la expansión de un subconjunto específico de células.

La expresión "efecto inmunomodulador", como se usa en el presente documento, se refiere a una estimulación (inmunoestimulante) o una inhibición (inmunomodulador) del desarrollo o del mantenimiento de una respuesta inmunológica. La inhibición se puede efectuar mediante, por ejemplo, la eliminación de las células inmunes (por ejemplo, linfocitos T o B); inducción o generación de células inmunes que pueden modular (por ejemplo, regular negativamente) la capacidad funcional de otras células; inducción de un estado no interactivo en las células inmunes (por ejemplo, anergia); o aumento, reducción o cambio de la actividad o función de las células inmunes, incluyendo, por ejemplo, modificación del patrón de las proteínas expresadas por dichas células (por ejemplo, alteración de la producción y/o secreción de ciertas clases de moléculas tales como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, factores de transcripción, quinasas, moléculas coestimulantes u otros receptores de la superficie celular, y similares). Un "agente inmunomodulador" se refiere a un agente que tiene un efecto inmunomodulador sobre una célula. En algunas realizaciones, un agente inmunomodulador tiene un efecto citotóxico o citostático sobre una célula inmune que promueve una respuesta inmune.

El término "marcador" se refiere a un compuesto o una composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la modificación química de un compuesto o de una composición sustrato que sea detectable. Se puede preparar un agente de unión a la diana marcado y usarlo en diversas aplicaciones, incluyendo diagnósticos *in vitro* e *in vivo*.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que habitualmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta de la forma o configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el anticuerpo donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente de la de las células naturales.

La expresión "secuencias de control" se refiere a las secuencias polinucleotídicas necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida operativamente en un determinado organismo huésped. Las secuencias de control adecuadas para su uso en células procariotas incluyen, por ejemplo, secuencias de sitios de unión al promotor, operador y ribosoma. Las secuencias de control eucariotas incluyen, pero sin limitación, promotores, señales de poliadenilación y potenciadores. Dichas secuencias de control se pueden utilizar para la expresión y la producción de agente de unión anti-diana en células huésped procariotas y eucariotas.

Una secuencia de ácido nucleico está "unida operativamente" cuando está situada en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, una presecuencia o líder secretor de ácido nucleico está unido operativamente a ácido nucleico que codifica un polipéptido si el mismo es expresado en forma de preproteína que precipita en la secreción del polipéptido; un promotor o reforzador está unido operativamente a una secuencia de codificación si el mismo afecta a la traducción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia de codificación si el mismo está situado para facilitar la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. No obstante, los reforzadores no tienen que estar contiguos. La unión se consigue mediante la unión en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se pueden usar adaptadores o enlazadores oligonucleótidos sintéticos para ligar las secuencias de ADN.

El término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y su equivalente, y no se refiere a una longitud específica de un producto; por lo tanto, en la definición de polipéptido, se incluyen "péptidos" y "proteínas". También se incluyen en la definición de polipéptidos los "anticuerpos" como se definen en el presente documento. Una "región polipeptídica" se refiere a un segmento de un polipéptido, segmento que puede contener, por ejemplo, uno o más dominios o motivos (por ejemplo, una región polipeptídica de un anticuerpo puede contener, por ejemplo, una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR)). El término "fragmento" se refiere a una porción de un polipéptido que tiene normalmente al menos 20 aminoácidos contiguos o al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido. Un "derivado" es un polipéptido o fragmento del mismo que tiene una o más sustituciones de aminoácidos no conservadoras o conservadoras con respecto a un segundo polipéptido; o un polipéptido o fragmento del mismo que se modifica mediante unión covalente de una segunda molécula tal como, por ejemplo, mediante la unión de un polipéptido heterólogo, o mediante glucosilación, acetilación, fosforilación y similares. Se incluyen además dentro de la definición de "derivado", por ejemplo, los polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (por ejemplo, aminoácidos no naturales y similares), polipéptidos con enlaces no sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto naturales como no naturales.

Un polipéptido "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. Un polipéptido aislado incluye un anticuerpo aislado, o un fragmento o derivado del mismo. "Anticuerpo" incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo estará purificado (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo según lo determinado por el método de Lowry, y en otros aspectos hasta más del 99 % en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria; o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul Coomassie preferentemente, con plata.

El término "heterólogo", en el contexto de un polipéptido, significa que procede de una fuente diferente (por ejemplo, una célula, un tejido, un organismo o una especie) en comparación con otro polipéptido, de modo que los dos polipéptidos son diferentes. Por lo general, un polipéptido heterólogo es de una especie diferente.

En el contexto de los polipéptidos de inmunoglobulinas o fragmentos de los mismos, "sustitución conservadora" significa la sustitución de uno o más aminoácidos que no reduce sustancialmente la unión específica (por ejemplo, medida por la K_D) del polipéptido de inmunoglobulina o fragmento del mismo a un antígeno (es decir, sustituciones que aumentan la afinidad de unión, que no alteran significativamente la afinidad de unión o que reducen la afinidad de unión en no más del aproximadamente 40 %, normalmente no más del aproximadamente 30 %, más normalmente no más del aproximadamente 20 %, incluso más normalmente no más del aproximadamente 10 %, o lo más normalmente no más del aproximadamente 5 %, según lo determinado por ensayos de unión convencionales tales como, por ejemplo, ELISA).

El término "idéntico" o la expresión "porcentaje de identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o restos de aminoácido que son iguales, cuando se comparan y alinean para obtener una correspondencia máxima. Para determinar el porcentaje de identidad, se alinean las secuencias con el fin de obtener una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para obtener la alineación óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácido nucleico). A continuación, se comparan los restos de aminoácidos o nucleótidos situados en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición de la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente de la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias depende del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = n° de posiciones idénticas/ n° total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). En algunas realizaciones, las dos secuencias tienen la misma longitud.

La expresión "sustancialmente idénticos", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 % o al menos el 65 % de identidad; normalmente al menos el 70 % o al menos el 75 % de identidad; más normalmente al menos el 80 % o al menos el 85 % de identidad; e incluso más normalmente al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 98 % de identidad (por ejemplo, según lo determinado usando uno de los métodos expuestos más adelante).

El término "similitud" o la expresión "porcentaje de similitud" en el contexto de dos o más secuencias polipeptídicas se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos que son iguales o están sustituidos de forma conservadora cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, medida mediante uno de los métodos indicados más adelante. A modo de ejemplo, una primera secuencia de aminoácidos se puede considerar similar a una segunda secuencia de aminoácidos cuando la primera secuencia de aminoácidos es al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 % o 95 % idéntica, o sustituida conservadoramente, a la segunda secuencia de aminoácidos si se compara con un número de aminoácidos igual al número contenido en la primera secuencia, o cuando se compara con una alineación de polipéptidos que se ha alineado mediante, por ejemplo, uno de los métodos expuestos más adelante.

Las expresiones "similitud sustancial" o "sustancialmente similar", en el contexto de secuencias de polipéptidos, indican que una región polipeptídica tiene una secuencia con al menos el 70 %, normalmente al menos el 80 %, más normalmente al menos el 85 % o al menos el 90 % o al menos el 95 % de similitud con una secuencia de referencia. Por ejemplo, un polipéptido es sustancialmente similar a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren en una o más sustituciones conservadoras.

En el contexto de los anticuerpos, o derivados de los mismos, una proteína que tiene una o más regiones polipeptídicas sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a una o más regiones de unión al antígeno (por ejemplo, una región variable de cadena pesada o ligera, o una CDR de cadena pesada o ligera) de un anticuerpo conserva la unión específica a un epítipo reconocido por el anticuerpo, determinada usando cualquiera de los diversos inmunoensayos convencionales conocidos en la técnica o a los que se hace referencia en el presente documento.

La determinación del porcentaje de identidad o porcentaje de similitud entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante preferido de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 90: 5873-5877. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, 1990, *J Mol. Biol.* 215: 403-410. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico que codifique una proteína de interés. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a la proteína de interés. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. Como alternativa, se puede usar PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecte relaciones distantes entre moléculas (*Id.*). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Otro ejemplo no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineación de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla de restos de peso PAM 120, una penalización de longitud de hueco de 12 y una penalización de hueco de 4. Los algoritmos adicionales para el análisis de secuencias son conocidos en la técnica e incluyen ADVANCE y ADAM según lo descrito en Torellis y Robotti, 1994, *Comput. Appl. Biosci.* 10: 3-5; y FASTA descrito en Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:2444-8. Dentro de FASTA, ktup es una opción de control que ajusta la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda. Si ktup = 2, se encuentran regiones similares en las dos secuencias que se están comparando mirando los pares de restos alineados; si ktup = 1, se examinan aminoácidos alineados individuales. ktup se puede configurar en 2 o 1 para

secuencias de proteínas, o de 1 a 6 para secuencias de ADN. El valor por defecto si no se especifica ktup es 2 para las proteínas y 6 para el ADN. Como alternativa, la alineación de secuencias de proteínas se puede llevar a cabo usando el algoritmo CLUSTAL W, según lo descrito por Higgins *et al.*, 1996, *Methods Enzymol.* 266: 383-402.

- 5 Como se usan en el presente documento, el término "célula", y las expresiones "línea celular" y "cultivo celular" se usan indistintamente, y la totalidad de dichas designaciones incluye sus progenies. Por lo tanto, "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula diana primaria y los cultivos derivados de la misma sin tener en cuenta el número de transferencias. También se entiende que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o de origen natural. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que se rastrea en la célula originalmente transformada. Cuando se pretendan dar a entender designaciones diferentes, quedará claro a partir del contexto.

- 15 El término "sujeto" con fines de tratamiento se refiere a cualquier animal, particularmente un animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas y similares. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

- 20 Un "trastorno", como se usa en el presente documento, y las expresiones "trastorno asociado a la diana" y "enfermedad asociada a la diana" se refieren a cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con un agente de unión anti-diana, según lo descrito en el presente documento. Un "trastorno asociado a la diana" y una "enfermedad asociada a la diana" normalmente expresan el antígeno diana, o un fragmento del mismo, en la superficie celular. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen el mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes o trastornos por tratar en el presente documento incluyen cáncer, neoplasias hematológicas, tumores benignos y malignos, leucemias y tumores malignos linfoides, carcinomas, y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos. Los ejemplos específicos de trastornos se desvelan más adelante.

- 30 Los términos "tratamiento" y "terapia", y similares, como se usan en el presente documento, pretenden incluir medidas terapéuticas, así como profilácticas o supresoras para una enfermedad o un trastorno que conducen a cualquier efecto clínicamente deseable o beneficioso, incluyendo, pero sin limitación, el alivio o la mitigación de uno o más síntomas, la regresión, la ralentización o el cese de la progresión de la enfermedad o del trastorno. Así pues, por ejemplo, el tratamiento a largo plazo incluye la administración de un agente antes o después de la aparición de un síntoma de una enfermedad o un trastorno, evitando o eliminando así todos los signos de la enfermedad o del trastorno. Como otro ejemplo, el término incluye la administración de un agente tras la manifestación clínica de la enfermedad para combatir los síntomas de la enfermedad. Además, "tratamiento" o "terapia", como se usan en el presente documento, incluyen la administración de un agente tras la aparición y una vez que los síntomas clínicos se han desarrollado donde la administración afecta a parámetros clínicos de la enfermedad o del trastorno tales como el grado de lesión tisular, o la cantidad o la extensión de la metástasis, independientemente de si el tratamiento conduce a la mejora de la enfermedad o no.

- 40 Como se usan en el presente documento, los términos "prevención" o "prevenir" se refieren a la administración de un agente de unión anti-diana a un sujeto antes de la aparición de un síntoma clínico o de diagnóstico de un cáncer o un trastorno inmunológico que exprese la diana (por ejemplo, administración a un individuo con predisposición o un alto riesgo de adquirir el cáncer o trastorno inmunológico que expresa la diana) para (a) bloquear la aparición o el comienzo del cáncer o trastorno inmunológico que expresa la diana, o uno o más síntomas clínicos o de diagnóstico de los mismos; (b) inhibir la gravedad de la aparición del cáncer o trastorno inmunológico que expresa la diana; o (c) disminuir la probabilidad de la aparición del cáncer o trastorno inmunológico que expresa la diana.

- 50 La expresión "infusión intravenosa" se refiere a la introducción de un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, en la vena de un paciente animal o humano durante un período de tiempo superior a aproximadamente 15 minutos, generalmente de entre aproximadamente 30 y 90 minutos.

- 55 La expresión "bolo intravenoso" o "empuje intravenoso" se refiere a la administración del fármaco en una vena de un animal o ser humano de manera que el cuerpo recibe el fármaco en aproximadamente 15 minutos o menos, generalmente en 5 minutos o menos.

- 60 La expresión "administración subcutánea" se refiere a la introducción de un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, debajo de la piel de un paciente animal o humano, normalmente en un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración sostenida relativamente lenta desde un receptáculo de fármaco. Pinchando o levantando la piel hacia arriba, separándola del tejido subyacente, se puede crear el bolsillo.

- El término "prospecto" se usa para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos.

- 65 Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para la administración de un fármaco (tal como un anticuerpo) a un mamífero. Los componentes del liposoma se

disponen habitualmente en una formación de doble capa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

La expresión "infusión subcutánea" se refiere a la introducción de un fármaco bajo la piel de un paciente animal o humano, preferentemente dentro de un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, mediante la administración sostenida relativamente lenta desde el receptáculo de un fármaco durante un período de tiempo incluyendo, pero sin limitación, 30 minutos o menos, o 90 minutos o menos. Opcionalmente, la infusión se puede realizar mediante la implantación subcutánea de una bomba de administración de fármacos implantada bajo la piel del paciente animal o humano, donde la bomba suministra una cantidad predeterminada de fármaco durante un período de tiempo predeterminado, tal como 30 minutos, 90 minutos, o un período de tiempo que abarca la duración del régimen de tratamiento.

La expresión "bolo subcutáneo" se refiere a la administración del fármaco bajo la piel de un paciente animal o humano, donde la administración del fármaco en bolo dura menos de aproximadamente 15 minutos. En otro aspecto, menos de 5 minutos, y en aún otro aspecto, menos de 60 segundos. En todavía otro aspecto más, la administración se realiza dentro de un bolsillo entre la piel y el tejido subyacente, donde el bolsillo se puede crear pinchando o levantando la piel hacia arriba, separándola del tejido subyacente.

La expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un agente de unión anti-diana (por ejemplo, un anticuerpo o derivado u otro agente de unión) que es suficiente para inhibir la aparición o mejorar uno o más síntomas clínicos o de diagnóstico de un cáncer o trastorno inmunológico en un sujeto. Una cantidad eficaz de un agente se administra de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento en una "pauta eficaz". La expresión "pauta eficaz" se refiere a una combinación de cantidad de agente y frecuencia de dosificación adecuada para llevar a cabo el tratamiento o la prevención del cáncer o trastorno inmunológico.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se usa para referirse a una cantidad de un agente terapéutico que tiene resultado beneficioso en el paciente, por ejemplo, un efecto de detención del crecimiento o la eliminación de la célula. En un aspecto, la cantidad terapéuticamente efectiva tiene actividad apoptótica, o es capaz de inducir la muerte celular. En otro aspecto, la cantidad terapéuticamente eficaz se refiere a una concentración en suero diana que ha demostrado ser eficaz en, por ejemplo, la ralentización de la progresión de la enfermedad. La eficacia se puede medir de formas convencionales, dependiendo de la afección que se vaya a tratar. Por ejemplo, en enfermedades neoplásicas o trastornos caracterizados por células que expresan un antígeno diana, la eficacia se puede medir mediante la evaluación del tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP), o la determinación de las tasas de respuesta (RR).

La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa aprobado por un organismo regulador del gobierno federal o un gobierno estatal o indicado en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea reconocida en general para su uso en animales, y más particularmente, en seres humanos. La expresión "ingrediente farmacéuticamente compatible" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable con el que se administra un agente de unión a la diana.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un agente de unión anti-diana o agente terapéutico. El agente de unión anti-diana o agente terapéutico contiene al menos un grupo amino, y por consiguiente, se pueden formar sales de adición de ácido con dicho grupo amino u otros grupos adecuados. Los ejemplos de sales incluyen, pero sin limitación, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)). Una sal farmacéuticamente aceptable puede implicar la inclusión de otra molécula, tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contraión. El contraión puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabilice la carga en el compuesto precursor. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Los casos en los que varios átomos cargados forman parte de la sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

La expresión "solvato farmacéuticamente aceptable" o "solvato" se refieren a una asociación de una o más moléculas de disolvente y un agente de unión anti-diana y/o agente terapéutico. Los ejemplos de disolventes que forman solvatos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, agua, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético y etanolamina.

La abreviatura "AFP" se refiere a dimetilvalina-valina-dolaisoleunina-dolaproína-fenilalanina-*p*-fenilendiamina.

La abreviatura "MMAE" se refiere a monometil-auristatina E.

La abreviatura "AEB" se refiere a un éster producido mediante la reacción de auristatina E con ácido paraacetil-

benzoico.

La abreviatura "AEVB" se refiere a un éster producido mediante la reacción de auristatina E con ácido benzoilvalérico.

5

La abreviatura "MMAF" se refiere a dovalina-valina-dolaisoleunina-dolaproína-fenilalanina.

Las abreviaturas "fk" y "phe-lys" se refieren al enlazador fenilalanina-lisina.

10

La abreviatura "mc" se refiere a maleimidocaproilo.

Las abreviaturas "vc" y "val-cit" se refieren al enlazador peptídico valina-citrulina.

15

La abreviatura "mcMMAF" se refiere a maleimidocaproil-MMAF.

La abreviatura "vcMMAF" se refiere al enlazador maleimidocaproil-valina-citrulina-*p*-aminobencilcarbamoilo.

II. Anticuerpos y derivados de los mismos

20

Las composiciones y los métodos descritos en el presente documento abarcan el uso de un agente de unión a la diana variante que se une específicamente a un antígeno diana en una célula. El agente de unión a la diana puede ejercer un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador en las células cancerosas, células inmunes u otras células diana que expresan el antígeno diana. El agente de unión a la diana puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, un derivado del mismo, u otro agente de unión que comprende una porción de una región Fc de un anticuerpo. El agente de unión a la diana también puede incluir al menos una región determinante de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo de unión a la diana.

25

En un aspecto, el agente de unión a la diana comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) idénticas, sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a una o más CDR de un anticuerpo de unión a la diana. Por ejemplo, el agente de unión puede incluir una CDR de cadena pesada y/o una CDR de cadena ligera que es idéntica o sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de cadena pesada correspondiente (regiones H1, H2 o H3) o una CDR de cadena ligera correspondiente (regiones L1, L2 o L3) de un anticuerpo monoclonal. En realizaciones típicas, el agente de unión anti-diana tiene dos o tres CDR de cadena pesada y/o dos o tres CDR de cadena ligera que son idénticas, sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a las correspondientes CDR de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo monoclonal.

30

35

En una realización específica, se pueden usar anticuerpos conocidos para el tratamiento o la prevención del cáncer. Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa se pueden obtener comercialmente o se pueden producir mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tal como, por ejemplo, técnicas de expresión recombinante. La secuencia de nucleótidos que codifica anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de célula cancerosa se puede obtener, por ejemplo, de la base de datos GenBank o una base de datos similar, las publicaciones de la literatura o por clonación y secuenciación de rutina. Los ejemplos de anticuerpos disponibles para el tratamiento del cáncer incluyen, pero sin limitación, anticuerpo monoclonal humanizado contra HER2, HERCEPTIN (trastuzumab; Genentech) para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico; RITUXAN (rituximab; Genentech) que es un anticuerpo monoclonal quimérico contra CD20 para el tratamiento de pacientes con linfoma no Hodgkin; OvaRex (AltaRex Corporation, MA), que es un anticuerpo murino para el tratamiento del cáncer de ovario; Panorex (Glaxo Wellcome, NC), que es un anticuerpo IgG2a murino para el tratamiento del cáncer colorrectal; Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY) que es un anticuerpo quimérico IgG contra EGFR para el tratamiento de los cánceres positivos en el factor de crecimiento epidérmico, tales como el cáncer de cabeza y cuello; Vitaxin (MedImmune, Inc., MD) que es un anticuerpo humanizado para el tratamiento del sarcoma; Campath I/H (Leukosite, MA), que es un anticuerpo IgG1 humanizado para el tratamiento de la leucemia linfocítica crónica (CLL); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA), que es un anticuerpo IgG humanizado contra CD33 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (AML); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ), que es un anticuerpo IgG humanizado contra CD22 para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA), que es un anticuerpo humanizado contra HLA-DR para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; Oncolym (Techniclone, Inc., CA), que es un anticuerpo murino radiomarcado contra HLA-Dr10 para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; Allomune (Bio Transplant, CA), que es un mAb humanizado contra CD2 para el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o el linfoma no Hodgkin; Avastin (Genentech, Inc., CA) que es un anticuerpo humanizado contra VEGF para el tratamiento del cáncer de pulmón y colorrectal; Epratuzamab (Immunomedics, Inc., NJ y Amgen, CA), que es un anticuerpo contra CD22 para el tratamiento del linfoma no Hodgkin; y CEACcide (Immunomedics, NJ), que es un anticuerpo humanizado contra CEA para el tratamiento del cáncer colorrectal.

40

45

50

55

60

Otros anticuerpos útiles en el tratamiento del cáncer incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos contra los siguientes antígenos: CA125 (ovario), CA15-3 (carcinomas), CA19-9 (carcinomas), L6 (carcinomas), Lewis Y (carcinomas), Lewis X (carcinomas), α -fetoproteína (carcinomas), CA 242 (colorrectal), fosfatasa alcalina placentaria (carcinomas), antígeno específico de la próstata (próstata), fosfatasa ácida prostática (próstata), factor de

65

- crecimiento epidérmico (carcinomas), MAGE-1 (carcinomas), MAGE-2 (carcinomas), MAGE-3 (carcinomas), MAGE-4 (carcinomas), receptor anti-transferrina (carcinomas), p97 (melanoma), MUC1-KLH (cáncer de mama), CEA (colorrectal), gp100 (melanoma), MART1 (melanoma), PSA (próstata), receptor IL-2 (leucemia de linfocitos T y linfomas), CD20 (linfoma no de Hodgkin), CD52 (leucemia), CD33 (leucemia), CD22 (linfoma), gonadotropina coriónica humana (carcinoma), CD38 (mieloma múltiple), CD40 (linfoma), mucina (carcinomas), P21 (carcinomas), MPG (melanoma) y producto oncogénico Neu (carcinomas). Algunos anticuerpos específicos útiles incluyen, pero sin limitación, mAb BR96 (Trail, P. A., Willner, D., Lasch, S. J., Henderson, A. J., Hofstead, S. J., Casazza, A. M., Firestone, R. A., Hellström, I., Hellström K. E., "Cure of Xenografted Human Carcinomas by BR96-Doxorubicin Immunoconjugates" *Science* 1993, 261, 212-215), BR64 (Trail, P. A., Willner, D., Knipe, J., Henderson, A. J., Lasch, S. J., Zoeckler, M. E., Trailsmith, M. D., Doyle, T. W., King, H. D., Casazza, A. M., Braslawsky, G. R., Brown, J. P., Hofstead, S. J., (Greenfield, R. S., Firestone, R. A., Mosure, K., Kadow, D. F., Yang, M. B., Hellstrom, K. E. y Hellstrom, I. "Effect of Linker Variation on the Stability, Potency, and Efficacy of Carcinoma-reactive BR64-Doxorubicin Immunoconjugates" *Cancer Research* 1997, 57, 100 105, anticuerpos monoclonales contra el antígeno CD40, tales como mAb S2C6 (Francisco, J. A., Donaldson, K. L., Chace, D., Siegall, C. B. y Wahl, A. F. "Agonistic properties and in vivo antitumor activity of the anti-CD-40 antibody, SGN-14", *Cancer Res.* 2000, 60, 3225-3231), anticuerpos monoclonales contra el antígeno CD70, tales como mAb 1F6 y mAb 2F2, y anticuerpos monoclonales contra el antígeno CD30, tales como AC10 (Bowen, M. A., Olsen, K. J., Cheng, L., Avila, D. y Podack, E. R. "functional effects of CD30 on a large granular lymphoma cell line YT", *J. Immunol*, 151, 5896-5906, 1993: Wahl et al., 2002 *Cancer Res.* 62 (13): 3736-42). Se pueden usar otros muchos anticuerpos de interiorización que se unen a antígenos asociados a tumores, y han sido revisados (Franke, A. E., Sievers, E. L. y Scheinberg, D. A., "Cell surface receptor-targeted therapy of acute myeloid leukemia: a review", *Cancer Biother Radiopharm.* 2000,15, 459 76; Murray, J. L., "Monoclonal antibody treatment of solid tumors: a coming of age" *Semin Oncol.* 2000, 27, 64 70; Breitling, F. y Dubel, S., "Recombinant Antibodies", John Wiley y Sons, Nueva York, 1998).
- En ciertas realizaciones, el anticuerpo no es Trastuzumab (de longitud completa, anti-HER2 humanizado (PM = 145.167)), F(ab')₂ de herceptina (derivado de anti-HER2 enzimáticamente (PM = 100.000)), 4D5 (de longitud completa, murino antiHER2, a partir del hibridoma), rhu4D5 (expresado transitoriamente, anticuerpo humanizado de longitud completa), rhuFab4D5 (Fab humanizado recombinante (PM = 47.738)), 4D5Fc8 (de longitud completa, antiHER2 murino, con dominio de unión a FcRn mutado) ni Hg (4D5 humanizado de longitud completa "sin bisagra", con cisteínas bisagra de cadena pesada mutadas a serinas, expresado en *E. coli* (por lo tanto, no glucosilado)).

En una realización específica, el agente de unión a la diana (por ejemplo, anticuerpo) comprende una región de unión que se une específicamente a CD20, CD30, CD33 o CD70.

- En otra realización específica, los anticuerpos conocidos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmune se usan de acuerdo con las composiciones de la invención. Los anticuerpos inmunoespecíficos para un antígeno de una célula que es responsable de la producción de anticuerpos autoinmunes se pueden obtener de cualquier institución (por ejemplo, un científico de una universidad o una empresa) o producirse mediante cualquier método conocido por un experto en la materia tales como, por ejemplo, técnicas de síntesis químicas o expresión recombinante. En otra realización, los anticuerpos útiles son inmunoespecíficos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes incluyendo, pero sin limitación, anticuerpo antinuclear; ADN anti-doble hebra; ADN anti-una sola hebra, anticuerpo IgM anti-cardiolipina, IgG; anticuerpo IgM anti-fosfolípidos, IgG; anticuerpo anti-SM; anticuerpo anti-mitocondrial; anticuerpos de la tiroides; anticuerpo microsomal; anticuerpo tiroglobulina; anti-SCL 70; anti-Jo; anti-U1RNP; anti-La/SSB; anti-SSA; anti-SSB; anticuerpo anti-células peritales; anti-histonas; anti-RNP; C ANCA; P ANCA; anti-centrómero; anti-fibrilarina y anticuerpo anti-GBM.

- En ciertas realizaciones, los anticuerpos útiles se pueden unir a un receptor o un complejo de receptores expresado en un linfocito activado. El receptor o el complejo de receptores pueden comprender un miembro de la superfamilia de genes de inmunoglobulina, un miembro de la superfamilia de receptores de TNF, una integrina, un receptor de citocina, un receptor de quimiocinas, una proteína principal de histocompatibilidad, una lectina o una proteína de control de complementos. Los ejemplos no limitantes de miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas adecuados son CD2, CD3; CD4, CD8, CD19, CD22, CD28, CD79, CD90, CD152/CTLA4, PD 1 e ICOS. Los ejemplos no limitantes de miembros de la superfamilia de receptores de TNF adecuados son CD27, CD40, CD95/Fas, CD134/OX40, CD137/4 1BB, TNF R1, TNFR 2, RANK, TACI, BCMA, osteoprotegerina, Apo2/TRAIL R1, TRAIL R2, TRAIL R3, TRAIL R4 y APO 3. Los ejemplos no limitantes de integrinas adecuadas son CD11a, CD11b, CD11c, CD18, CD29, CD41, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD103 y CD 104. Los ejemplos no limitantes de lectinas adecuadas son de lectina de tipo C, tipo S y tipo I.

- En una realización específica, el agente de unión a la diana (por ejemplo, anticuerpo) comprende una región de unión que se une específicamente a CD19, CD20, CD30 o CD70.

- En una realización específica, el agente de unión a la diana comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) idénticas, sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a una o más CDR del anticuerpo monoclonal murino 1F6. (Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de 1F6 se exponen en la SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2, y SEC ID N°: 21 y SEC ID N°: 22, respectivamente, y se desvelan en la publicación de patente internacional N° WO 04/073656. Por ejemplo, el agente

de unión puede incluir una CDR de cadena pesada y/o una CDR de cadena ligera que sea idéntica o sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a la correspondiente CDR de cadena pesada (regiones H1, H2 o H3) o a la correspondiente CDR de cadena ligera (regiones L1, L2 o L3) del mAb 1F6. En realizaciones típicas, el agente de unión anti-diana tiene dos o tres CDR de cadena pesada y/o dos o tres CDR de cadena ligera que son idénticas, sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a las correspondientes CDR de cadena pesada y/o de cadena ligera de mAb 1F6.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, cuando el agente de unión anti-diana tiene al menos una CDR de cadena pesada sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de cadena pesada del anticuerpo monoclonal de unión a la diana, el agente de unión puede incluir además al menos una CDR de cadena ligera que sea sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de cadena ligera del anticuerpo monoclonal de unión a la diana.

En algunas realizaciones, el agente de unión anti-diana incluye un dominio variable de cadena pesada o ligera, teniendo el dominio variable (a) un conjunto de tres CDR idénticas, sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a las correspondientes CDR de un anticuerpo monoclonal de unión a la diana; y (b) un conjunto de cuatro regiones marco de la región variable de una inmunoglobulina humana. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD70 puede incluir uno o varios dominios variables de cadena pesada y/o de cadena ligera, teniendo el uno o varios dominios variables (a) un conjunto de tres CDR, en el que el conjunto de CDR son del anticuerpo monoclonal 1F6; y (b) un conjunto de cuatro regiones marco derivadas de una IgG humana. El anticuerpo puede incluir opcionalmente una región bisagra. En una realización ilustrativa, el anticuerpo anti-CD70 es un anticuerpo completamente humanizado.

En otro aspecto, el agente de unión a la diana comprende una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a una o más CDR del anticuerpo monoclonal 2F2. (Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de 2F2 se exponen en la SEC ID N°: 27 y SEC ID N°: 28, y SEC ID N°: 29 y SEC ID N°: 30, respectivamente, y se desvelan en la publicación de patente internacional N° WO 04/073656. Por ejemplo, el agente de unión puede incluir una CDR de cadena pesada y/o una CDR de cadena ligera que sea idéntica o sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a la correspondiente CDR de cadena pesada (regiones H1, H2 o H3) o a la correspondiente CDR de cadena ligera (regiones L1, L2 o L3) del mAb 2F2. En realizaciones típicas, el agente de unión anti-diana tiene dos o tres CDR de cadena pesada y/o dos o tres CDR de cadena ligera que son idénticas, sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a las correspondientes CDR de cadena pesada y/o de cadena ligera de mAb 2F2.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, cuando el agente de unión anti-CD70 tiene al menos una CDR de cadena pesada sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de cadena pesada del mAb 2F2, el anticuerpo o derivado del mismo puede incluir además al menos una CDR de cadena ligera que sea sustancialmente idéntica o sustancialmente similar a una CDR de cadena ligera de mAb 2F2.

En algunas realizaciones, el agente de unión anti-diana incluye un dominio variable de cadena pesada o ligera, teniendo el dominio variable (a) un conjunto de tres CDR idénticas, sustancialmente idénticas o sustancialmente similares a las correspondientes CDR de mAb 2F2; y (b) un conjunto de cuatro regiones marco de la región variable de una inmunoglobulina humana. Por ejemplo, un anticuerpo anti-CD70 puede incluir uno o varios dominios variables de cadena pesada y/o de cadena ligera, teniendo el uno o varios dominios variables (a) un conjunto de tres CDR, en el que el conjunto de CDR son del anticuerpo monoclonal 2F2; y (b) un conjunto de cuatro regiones marco derivadas de una IgG humana. El anticuerpo puede incluir opcionalmente una región bisagra. En una realización ilustrativa, el anticuerpo anti-CD70 es un anticuerpo completamente humanizado.

En algunas realizaciones, las regiones marco se seleccionan entre las secuencias de los exones de línea germinal humanos V_H, J_H, V_K y J_K. Por ejemplo, las secuencias aceptoras para la humanización de la FR de un dominio V_H de c1F6 se pueden seleccionar entre los exones V_H de la línea germinal V_H1-18 (Matsuda *et al.*, 1993, *Nature Genetics* 3:88-94) o V_H1-2 (Shin *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10:3641-3645) y para la región bisagra (J_H), exón J_H-6 (Mattila *et al.*, 1995, *Eur. J. Immunol.* 25:2578-2582). En otros ejemplos, se pueden seleccionar el exón V_K de la línea germinal B3 (Cox *et al.*, 1994, *Eur. J. Immunol.* 24:827-836) y el exón J_K J_K-1 (Hieter *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:1516-1522) como secuencias aceptoras para la humanización del dominio V_L de c1F6.

En algunas realizaciones, la secuencia de la región marco del anticuerpo anti-CD70 humanizado incluye un derivado del exón de la línea germinal humano aceptor usado, incluyendo derivados en los que se vuelven a introducir restos del donante murino. Dichos restos incluyen la reintroducción del resto donante murino en una o más de las posiciones H46, H67, H68, H69, H70, H71, H80, H81, H82, H82A y H91 en el dominio V_H, de acuerdo con la convención de numeración de Kabat.

La siguiente **Tabla 1** indica las regiones de 1F6 y 2F2 humanizados a las que corresponde cada SEC ID N°.

Tabla 1

MOLÉCULA	NUCLEÓTIDO O AMINOÁCIDO	SEC ID N.º
Región variable de cadena pesada de c1F6	Nucleótido	1
Región variable de cadena pesada de c1F6	Aminoácido	2
hV _H -D de h1F6 + dominio constante de hlgG ₁	Nucleótido	3
hV _H -D de h1F6 + dominio constante de hlgG ₁	Aminoácido	4
hV _H -E de h1F6	Nucleótido	5
hV _H -E de h1F6	Aminoácido	6
hV _H -E de h1F6 + dominio constante de hlgG ₁	Nucleótido	7
hV _H -E de h1F6 + dominio constante de hlgG ₁	Aminoácido	8
hV _H -H de h1F6	Nucleótido	9
hV _H -H de h1F6	Aminoácido	10
hV _H -H de h1F6 + dominio constante de hlgG ₁	Nucleótido	11
hV _H -H de h1F6 + dominio constante de hlgG ₁	Aminoácido	12
hV _H -J de h1F6	Nucleótido	13
hV _H -J de h1F6	Aminoácido	14
hV _H -J de h1F6 + dominio constante de hlgG ₁	Nucleótido	15
hV _H -J de h1F6 + dominio constante de hlgG ₁	Aminoácido	16
hV _H -M de h1F6	Nucleótido	17
hV _H -M de h1F6	Aminoácido	18
hV _H -M de h1F6 + dominio constante de hlgG ₁	Nucleótido	19
hV _H -M de h1F6 + dominio constante de hlgG ₁	Aminoácido	20
Región variable de cadena ligera de c1F6	Nucleótido	21
Región variable de cadena ligera de c1F6	Aminoácido	22
hV _L A	Nucleótido	23
hV _L A	Aminoácido	24
hV _L A + dominio constante κ humano	Nucleótido	25
hV _L A + dominio constante κ humano	Aminoácido	26
Región variable de cadena pesada de c2F2	Nucleótido	27
Región variable de cadena pesada de c2F2	Aminoácido	28
Región variable de cadena ligera de c2F2	Nucleótido	29
Región variable de cadena ligera de c2F2	Aminoácido	30

En algunas realizaciones, el agente de unión a la diana puede ser un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión al antígeno del anticuerpo 1F6 o 2F2. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena de polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 6, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 14, SEC ID N.º: 18, o los aminoácidos 20-137 de SEC ID N.º: 4. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena de polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 24.

- 10 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena de polipéptido que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 6, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 14, SEC ID N.º: 18, o los aminoácidos 20-137 de SEC ID N.º: 4. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena de polipéptido que es al menos un 85 % idéntica a la secuencia de aminoácidos

de SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 18, o los aminoácidos 20-137 de SEC ID N°: 4. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena de polipéptido que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 18, o los aminoácidos 20-137 de la SEC ID N°: 4. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena de polipéptido que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 18, o los aminoácidos 20-137 de SEC ID N°: 4. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena de polipéptido que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 10, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 18, o los aminoácidos 20-137 de SEC ID N°: 4. En algunas realizaciones, el polipéptido no tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 1F6 o 2F2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena de polipéptido que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 24. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena de polipéptido que es al menos un 85 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 24. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena de polipéptido que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 24. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena de polipéptido que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 24. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno comprende una cadena de polipéptido que es al menos un 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 24. En algunas realizaciones, el polipéptido no tiene la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 1F6 o 2F2.

En algunas realizaciones, el agente de unión anti-diana compite con el anticuerpo monoclonal 1F6 o 2F2 por la unión a CD70 humano. En algunas realizaciones, el agente de unión a la diana no induce una señal agonista ni antagonista cuando se une a CD70 (por ejemplo, no estimula la proliferación). En algunas realizaciones, el agente de unión a la diana bloquea la unión de CD27 a CD70 en al menos un 20 %, al menos un 30 %, al menos un 40 %, al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 % o al menos un 90 %.

El agente de unión a la diana puede ser un anticuerpo, tal como un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario, un scFv, un diacuerpo, un Fab, un minicuerpo, un scFv-Fc, un Fv, o similares. En algunas realizaciones, una región de unión al antígeno puede estar unida a un dominio o dominios Fc tales como, por ejemplo, los dominios bisagra-CH2-CH3 de una inmunoglobulina, o una porción o un fragmento de uno o varios dominios efectores. Los fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno, incluyendo anticuerpos monocatenarios, pueden comprender, por ejemplo, una o varias regiones variables en combinación con la totalidad o una parte de un dominio de Fc (por ejemplo, un dominio CH2 y/o CH3 solo o en combinación con un dominio CH1, bisagra y/o CL). Además, los fragmentos de unión al antígeno pueden comprender cualquier combinación de dominios Fc. En algunas realizaciones, el anticuerpo puede ser un anticuerpo monocatenario que comprenda una región variable de unión al antígeno unida a dominios bisagra-CH2-CH3.

Los dominios Fc del agente de unión a la diana pueden ser de cualquier isotipo de inmunoglobulina humana adecuado.

El agente de unión a la diana se puede conjugar con un agente terapéutico, tal como un agente citotóxico, citostático o inmunomodulador. En una realización específica, el agente de unión a la diana se conjuga a un agente terapéutico tal como un agente citotóxico, citostático o inmunomodulador. Los agentes terapéuticos adecuados se describen en el presente documento.

Los agentes citotóxicos adecuados pueden ser, por ejemplo, una auristatina, un agente de unión al surco menor del ADN, un agente alquilante del surco menor del ADN, una enediina, una lexitropsina, una duocarmicina, un taxano, una puromicina, una dolastatina, un maitansinoide y alcaloide de la vinca. En realizaciones específicas, el agente citotóxico es AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, paclitaxel, docetaxel, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, dolastatina-10, equinomicina, combretastatina, caliqueamicina, maitansina, DM-1 o netropsina. Otros agentes citotóxicos adecuados incluyen agentes anti-tubulina, tales como una auristatina, un alcaloide de la vinca, una podofilotoxina, un taxano, un derivado de baccatina, una criptofisina, un maitansinoide, una combretastatina o una dolastatina. En realizaciones específicas, el agente antitubulina es AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB, auristatina E, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina, VP-16, camptotecina, paclitaxel, docetaxel, epotilona A, epotilona B, nocodazol, colchicina, colcidimid, estramustina, cemadotina, discodermolida, maitansina, DM-1 o eleuterobina.

Los agentes inmunomoduladores adecuados incluyen, por ejemplo, ganciclovir, etanercept, ciclosporina, tacrolimus, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato mofetil, metotrexato, cortisol, aldosterona, dexametasona, un inhibidor de la ciclooxigenasa, un inhibidor de la 5-lipoxigenasa o un antagonista del receptor de leucotrienos.

En los conjugados de fármaco y anticuerpo (ADC), el anticuerpo puede conjugarse directamente al agente citotóxico o a través de un enlazador. Los enlazadores adecuados incluyen, por ejemplo, enlazadores escindibles y no escindibles. Un enlazador escindible es normalmente susceptible a la escisión en condiciones intracelulares. Los

enlazadores escindibles adecuados incluyen, por ejemplo, un enlazador peptídico escindible por una proteasa intracelular, tal como la proteasa lisosomal o una proteasa endosomal. En realizaciones ilustrativas, el enlazador puede ser un enlazador dipeptídico, tal como un enlazador de valina-citrulina (val-cit) o de fenilalanina-lisina (phe-lys). Otros enlazadores adecuados incluyen enlazadores hidrolizables a un pH inferior a 5,5, tales como un enlazador de hidrazona. Los enlazadores escindibles adecuados adicionales incluyen enlazadores de disulfuro.

En algunas realizaciones, un agente de unión a la diana puede ser un anticuerpo quimérico que comprenda una región Fc humana o no humana o una parte de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo puede incluir un dominio Fc o una parte de origen no humano, por ejemplo, de roedor (por ejemplo, ratón o rata), asno, oveja, conejo, cabra, cobaya, camélido, caballo, pollo o mono (por ejemplo, macaco, *rhesus* o similar).

Un agente de unión a la diana, tal como un anticuerpo, puede ser monoespecífico, biespecífico, triespecífico o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos de diferentes epítomos de un antígeno diana y/o pueden ser específicos tanto de un antígeno diana como de un antígeno heterólogo. (Véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO 93/17715, WO 92/08802, WO 91/00360 y WO 92/05793; Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; patentes de EE.UU. N° 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; y 5.601.819; Kostelny *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553)). Los anticuerpos multiespecíficos, incluyendo los anticuerpos biespecíficos y triespecíficos, útiles para la práctica de los métodos descritos en el presente documento son anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a un antígeno diana y un segundo receptor o complejo de receptores de la superficie celular. En algunas realizaciones, la unión de la parte del anticuerpo multiespecífico con la segunda molécula o complejo de receptores de la superficie celular puede mejorar las funciones del agente de unión a la diana.

Los agentes de unión a la diana y sus derivados también se puede describir o especificar en términos de su afinidad de unión al antígeno diana. Las afinidades de unión típicas incluyen aquellas con una constante de disociación o Kd inferior a 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M o 10^{-15} M.

Los anticuerpos monoclonales útiles de la invención son poblaciones homogéneas de anticuerpos para un determinante antigénico particular, por ejemplo, un antígeno de célula (tal como un antígeno de célula de cáncer o un efector no maligno o un antígeno de célula accesorio), un antígeno viral, un antígeno microbiano, una proteína, un péptido, un carbohidrato, un producto químico, un ácido nucleico o fragmentos de unión al antígeno del mismo). Un anticuerpo monoclonal (mAb) contra un antígeno de interés se puede preparar usando cualquier técnica conocida en la técnica, incluyendo, por ejemplo, el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación de fagos, o una combinación de las mismas. Las técnicas de hibridoma se describen de manera general, por ejemplo, en Harlow *et al.*, "Antibodies: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, II ed., 1988); y Hammerling *et al.*, en "Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas", pág. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Estas incluyen, pero sin limitación, la técnica del hibridoma descrita originalmente por Köhler y Milstein (1975, *Nature* 256, 495-497), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4: 72), y la técnica del hibridoma de EBV (Cole *et al.*, 1985, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA e IgD y de cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce los mAb de uso en la presente invención se puede cultivar *in vitro* o *in vivo*.

Los ejemplos de métodos de presentación de fagos que se pueden usar para crear los anticuerpos incluyen, por ejemplo, los desvelados en Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581; Quan y Carter, 2002, "The rise of monoclonal antibodies as therapeutics in Anti-IgE and Allergic Disease", Jardieu and Fick Jr., eds., Marcel Dekker, Nueva York, NY, Capítulo 20, pág. 427-469; Brinkman *et al.*, 1995, *J. Immunol. Methods* 182:41-50; Ames *et al.*, 1995, *J. Immunol. Methods* 184:177-186; Kettleborough *et al.*, 1994, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958; Persic *et al.*, 1997, *Gene* 187:9-18; Burton *et al.*, 1994, "Advances in Immunology" 57:191-280; solicitud PCT N° PCT/GB91/01134; publicaciones PCT N° WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401 y patentes de EE.UU. N° 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108

Los ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir anticuerpos monocatenarios incluyen los descritos en las patentes de EE.UU. N° 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.*, 1991, "Methods in Enzymology" 203:46-88; Shu *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:7995-7999; y Skerra *et al.*, 1988, *Science* 240:1038-1040.

Los anticuerpos monoclonales útiles incluyen, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos y fragmentos de anticuerpos funcionalmente activos. Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar mediante cualquiera de las numerosas técnicas conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Teng *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 80:7308-7312; Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4:72-79; Olsson *et al.*, 1982, *Meth. Enzymol.* 92:3-16; y las patentes de EE.UU. N° 5.939.598 y 5.770.429).

- Se pueden producir anticuerpos completamente humanos usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes endógenos de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, pero que pueden expresar genes de cadenas pesadas y ligeras humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de las células B, y posteriormente sufren cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de dicha tecnología para producir anticuerpos humanos, véase, por ejemplo, Lonberg y Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93).
- Para una descripción detallada de dicha tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos, y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; y 5.545.806. Otros anticuerpos humanos se pueden adquirir comercialmente de, por ejemplo, Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Medarex (Sunnyvale, CA).
- Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada." En dicha metodología, se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo murino, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo, (véase, por ejemplo, Jespers *et al.*, 1994, *Biotechnology* 12: 899- 903). Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom y Winter, 1991, *J. Mol Biol.* 227: 381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581; Quan y Carter, 2002, "The rise of monoclonal antibodies as therapeutics, In *Anti-IgE and Allergic Disease*", Jardieu y Fick Jr., eds., Marcel Dekker, Nueva York, NY, Capítulo 20, pág. 427-469, Jardieu y Fick Jr., eds., Marcel Dekker, Nueva York, NY, capítulo 20, pág. 427-469).
- Además, también son útiles los anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden tanto porciones humanas como no humanas, que se pueden crear usando técnicas convencionales de ADN recombinante. (Véase, por ejemplo, Cabilly *et al.*, patente de estados Unidos N° 4.816.567; y Boss *et al.*, patente de Estados Unidos N° 4.816.397, ambas de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones de determinantes de la complementariedad (CDR) de las especies no humanas y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Queen, patente de EE.UU. N° 5.585.089, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad).
- En algunas realizaciones, los restos marco en las regiones marco humanas se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de la CDR para modificar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Dichas sustituciones marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la modelización de las interacciones de los restos de CDR y marco para identificar los restos marco que son importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar los restos marco poco habituales en determinadas posiciones. (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.585.089; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323). Los anticuerpos se pueden humanizar usando una variedad de técnicas conocidas en la materia, incluyendo, por ejemplo, el injerto de CDR (véase, por ejemplo, el documento EP 0239400; la publicación PCT N° WO 91/09967; las patentes de EE.UU. N° 5.225.539.; 5.530.101; y 5.585.089), el revestimiento o recubrimiento (véanse, por ejemplo, los documentos EP 0592106; EP 0519596; Padlan, 1991, "Molecular Immunology" 28(4/5):489-498; Studnicka *et al.*, 1994, *Protein Engineering* 7(6):805-814; Roguska *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 91:969-973) y el barajado de hebras (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.565.332).
- Dichos anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la materia, por ejemplo usando los métodos descritos en las publicaciones internacionales N° WO 87/02671 y WO 86/01533; las publicaciones de patente europea N° EP 0184187; EP 0171496; EP 0173494; y EP 012023; las patentes de EE.UU. N° 4.816.567 y 5.225.539; Berter *et al.*, 1988, *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 84:3439-3443; Liu *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci.* EE.UU. 84:214-218; Nishimura *et al.*, 1987, *Cancer. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.*, 1985, *Nature* 314:446-449; Shaw *et al.*, 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, 1985, *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.*, 1986, *BioTechniques* 4:214; Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:552-525; Verhoevan *et al.*, 1988, *Science* 239:1534; y Beidler *et al.*, 1988, *J. Immunol* 141:4053-4060.
- En algunas realizaciones, el anticuerpo es monoespecífico. El anticuerpo también puede ser un anticuerpo biespecífico. Los métodos para crear anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (véase, por ejemplo, Milstein *et al.*, 1983, *Nature* 305: 537-539). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. En la publicación internacional N° WO 93/08829, y en Traunecker *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659, se desvelan procedimientos similares.

De acuerdo con una metodología diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión normalmente es con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de los dominios bisagra, CH2 y CH3. Es preferible tener la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ácidos nucleicos con secuencias que codifican las fusiones de cadenas pesadas de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias de codificación para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales dé rendimientos elevados o cuando las proporciones no sean de particular importancia.

En una realización de dicha metodología, los anticuerpos biespecíficos pueden tener una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Dicha estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, pues la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación (publicación internacional N° WO 94/04690).

Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, 1996, "Methods in Enzymology" 121:210; Rodrigues *et al.*, 1993, *J. Immunology* 151:6954-6961; Carter *et al.*, 1992, *Bio/Technology* 10:163-167; Carter *et al.*, 1995, *J. Hematotherapy* 4:463-470; Merchant *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology* 16:677-681. Usando dichas técnicas, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos para su uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad como se define en el presente documento.

En la publicación de patente europea EP 0105360, también se describen los anticuerpos bifuncionales. Como se desvela en dicha referencia, los anticuerpos híbridos o bifuncionales pueden derivarse biológicamente, por ejemplo, mediante técnicas de fusión celular, o químicamente, especialmente con agentes de reticulación o reactivos formadores de puentes disulfuro, y pueden comprender anticuerpos completos o fragmentos de los mismos. Los métodos para obtener dichos anticuerpos híbridos se desvelan, por ejemplo, en la publicación internacional N° WO 83/03679, y en la publicación de patente europea N° EP 0217577.

El anticuerpo también puede ser un fragmento, derivado o análogo funcionalmente activo de un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno diana deseado (por ejemplo, un antígeno de célula cancerosa o un antígeno de célula efectora no maligna) u otros anticuerpos unidos a una o varias células diana o a una matriz. En este sentido, la expresión "funcionalmente activo" significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de generar anticuerpos anti-anti-idiotipo, que reconocen el mismo antígeno reconocido por el anticuerpo del que se obtiene el fragmento, derivado o análogo. En una realización ilustrativa, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina puede potenciarse mediante la eliminación de las secuencias marco y CDR que son C-terminales con respecto a la secuencia CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias de CDR se unen al antígeno, se pueden usar los péptidos sintéticos que contienen las secuencias de CDR en ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier método de ensayo de unión conocido en la técnica (por ejemplo, el ensayo BIAcore) (véase, por ejemplo, Kabat *et al.*, 1991, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edición, National Institute of Health, Bethesda, Md; Kabat *et al.*, 1980, *J. Immunology* 125(3):961-969).

Otros anticuerpos útiles incluyen fragmentos de anticuerpos tales como, pero sin limitación, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fab', fragmentos Fab, Fvs, anticuerpos monocatenarios (SCA) (por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. N° 4.946.778; Bird, 1988, *Science* 242:423-42; Huston *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 85:5879-5883; y Ward *et al.*, 1989, *Nature* 334:544-54), scFv, sc-Fv-Fc, FvdsFv, minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos o cualquier otra molécula que comprenda CDR y que tenga la misma especificidad que el anticuerpo.

En otras realizaciones, el anticuerpo es una proteína de fusión de un anticuerpo, o un fragmento funcionalmente activo del mismo, por ejemplo, en la que el anticuerpo está fusionado a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), ya sea en el terminal N o en el terminal C a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o parte de la misma, normalmente al menos una parte de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no sea el anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo pueden estar unido covalentemente a la otra proteína en el terminal N del dominio constante.

Como se ha expuesto *supra*, un agente de unión a la diana puede ser un derivado de un anticuerpo de unión a la diana. En general, un derivado de anticuerpo comprende un fragmento de unión al antígeno o polipéptidos sustituidos de manera conservadora y al menos una región polipeptídica u otro resto heterólogo al anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo se puede modificar, por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula.

Las modificaciones típicas incluyen, por ejemplo, la desglucosilación, glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular (por ejemplo, una molécula de unión a la albúmina) u otra proteína, y similares. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación, la escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc.

En algunas realizaciones, el derivado de anticuerpo es un multímero tal como, por ejemplo, un dímero, que comprende uno o más monómeros, donde cada monómero incluye (i) una región de unión al antígeno de un anticuerpo o una región polipeptídica derivada de la misma (tal como, por ejemplo, por sustitución conservadora de uno o más aminoácidos); y (ii) una región polipeptídica de multimerización (por ejemplo, dimerización), de manera que el derivado de anticuerpo forme multímeros (por ejemplo, homodímeros) que se unan específicamente al antígeno diana. En realizaciones típicas, una región de unión al antígeno de un anticuerpo, o una región polipeptídica derivada de la misma, se fusiona de manera recombinante o químicamente con una proteína heteróloga, donde la proteína heteróloga comprende un dominio de dimerización o multimerización. Antes de la administración del derivado de anticuerpo a un sujeto con el fin de tratar o prevenir trastornos inmunológicos o cánceres, el derivado se somete a condiciones que permitan la formación de un homodímero o un heterodímero. Un heterodímero, como se usa en el presente documento, puede comprender dominios de dimerización idénticos pero diferentes regiones de unión al antígeno, regiones de unión al antígeno idénticas pero diferentes dominios de dimerización, o diferentes regiones de unión al antígeno y dominios de dimerización.

Los dominios de dimerización típicos son aquellos que se originan a partir de factores de transcripción. En una realización, el dominio de dimerización es el de una cremallera de leucina de región básica ("bZIP") (véase Vinson *et al.*, 1989, *Science* 246: 911-916). Los dominios de cremallera de leucina útiles incluyen, por ejemplo, los del factor de transcripción de levadura GCN4, la proteína de unión al factor de transcripción humano CCAAT/potenciador C/EBP y la transformación nuclear en los productos oncogénicos Fos y Jun. (Véase, por ejemplo, Landschultz *et al.*, 1988, *Science* 240:1759-64; Baxeavanis y Vinson, 1993, *Curr. Op. Gen. Devel.* 3:278-285; O'Shea *et al.*, 1989, *Science* 243:538-542). En otra realización, el dominio de dimerización es el de una proteína de hélice-bucle-hélice de región básica ("bHLH"). (Véase, por ejemplo, Murre *et al.*, 1989, *Cell* 56:777-783. Véase también Davis *et al.*, 1990, *Cell* 60:733-746; Voronova y Baltimore, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87:4722-26). Son particularmente útiles las proteínas hHLH myc, max y mac.

En otras realizaciones más, el dominio de dimerización es una región constante de inmunoglobulina tal como, por ejemplo, una región constante de cadena pesada o un dominio de la misma (por ejemplo, un dominio C_{H1}, un dominio C_{H2} y/o un dominio C_{H3}). (Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.155.027; 5.336.603; 5.359.046; y 5.349.053; y los documentos EP 0367166; y WO 96/04388).

Se sabe que se forman heterodímeros entre Fos y Jun (Bohmann *et al.*, 1987, *Science* 238: 1386-1392), entre miembros de la familia ATF/CREB (Hai *et al.*, 1989, *Genes Dev.* 3: 2083-2090), entre miembros de la familia C/EBP (Cao *et al.*, 1991, *Genes Dev.* 5: 1538-1552; Williams *et al.*, 1991, *Genes Dev.* 5: 1553-1567; Roman *et al.*, 1990, *Genes Dev.* 4: 1404-1415), y entre miembros de las familias ATF/CREB y Fos/Jun (Hai y Curran, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 88: 3720-24). Por lo tanto, cuando se administra un agente de unión a la diana variante a un sujeto en forma de un heterodímero que comprende diferentes dominios de dimerización, se puede usar cualquier combinación de los anteriores.

En otras realizaciones, un derivado de anticuerpo es un anticuerpo conjugado con un segundo anticuerpo (un "heteroconjugado de anticuerpo") (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.676.980). Los heteroconjugados útiles para poner en práctica los presentes métodos comprenden un anticuerpo que se une al antígeno diana (por ejemplo, un anticuerpo que tiene las CDR y/o las cadenas pesadas de un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, 2F2 o 1F6) y un anticuerpo que se une a un receptor o a un complejo de receptores de la superficie. En una realización típica, la unión de la parte del anticuerpo multiespecífico con la segunda molécula o complejo de receptores de la superficie celular mejora las funciones del anticuerpo. En otras realizaciones, el anticuerpo puede ser un agente terapéutico. Los anticuerpos que son agentes terapéuticos adecuados se describen en el presente documento.

En realizaciones de ejemplo, el anticuerpo o derivado del mismo inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo monoclonal a su antígeno diana o un ligando del antígeno diana, según lo determinado por cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva (por ejemplo, un inmunoensayo). En realizaciones típicas, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal o del ligando en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 % o al menos un 75 %. En otras realizaciones, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal o el ligando en al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %.

En realizaciones de ejemplo, el anticuerpo o derivado del mismo inhibe competitivamente la unión del mAb 1F6 o 2F2 con CD70, según lo determinado por cualquier método conocido en la técnica para determinar la unión competitiva (tal como, por ejemplo, los inmunoensayos descritos en el presente documento). En realizaciones típicas, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión de 1F6 o 2F2 con CD70 en al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 70 % o al menos un 75 %. En otras realizaciones, el anticuerpo inhibe competitivamente la unión

de 1F6 o 2F2 con CD70 en al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %.

Los anticuerpos se pueden ensayar en cuanto a la unión específica a un antígeno diana mediante cualquiera de los diversos métodos conocidos. Los inmunoensayos que se pueden usar incluyen, por ejemplo, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos con proteína A. Dichos ensayos son rutinarios y muy conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds., "Short Protocols in Molecular Biology" (John Wiley and Sons, Inc., Nueva York, IV ed. 1999); Harlow y Lane, "Using Antibodies: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999).)

Además, la afinidad de unión de un anticuerpo hacia su antígeno diana y la velocidad de disociación de una interacción entre anticuerpo y diana se puede determinar mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno marcado (por ejemplo, ^3H o ^{125}I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno sin marcar, y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo por el antígeno diana y las velocidades de disociación se pueden determinar a partir de los datos mediante el análisis gráfico de Scatchard. La competencia con un segundo anticuerpo también se puede determinar usando radioinmunoensayos. En este caso, el antígeno se incuba con el anticuerpo de interés conjugado con un compuesto marcado (por ejemplo, ^3H o ^{125}I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no marcado. Como alternativa, la afinidad de unión de un anticuerpo a su antígeno y las velocidades de asociación y disociación de una interacción anticuerpo-antígeno se pueden determinar por resonancia de plasmón superficial. En algunas realizaciones, los anticuerpos o derivados de los mismos se pueden dirigir a y acumularse en la membrana de una célula que exprese el antígeno diana.

De acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, los agentes de unión a la diana variantes (por ejemplo, anticuerpos, o derivados o fragmentos de los mismos), cuando se conjugan con un agente terapéutico, se pueden interiorizar y acumularse dentro de una célula que exprese el antígeno diana, donde el agente terapéutico ejerce un efecto (por ejemplo, un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador). En realizaciones adicionales, los agentes de unión a la diana variantes (por ejemplo, anticuerpos, o derivados o fragmentos de los mismos), cuando se conjugan con un agente terapéutico, se pueden dirigir a y acumularse en la membrana de una célula que exprese el antígeno diana, donde el agente terapéutico ejerce un efecto (por ejemplo, un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador). En otras realizaciones más, los agentes de unión a la diana variantes (por ejemplo, anticuerpos, o derivados o fragmentos de los mismos), cuando se conjugan con un agente terapéutico, se pueden dirigir a una molécula biológica en una célula (por ejemplo, un agente inflamatorio) y acumularse en las células adyacentes que secreten o se unan a la molécula biológica, donde el agente terapéutico ejerce un efecto (por ejemplo, un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador).

Se puede determinar fácilmente si un agente de unión a la diana variante dado (por ejemplo, anticuerpo, o derivado o fragmento del mismo), cuando se conjuga con un agente terapéutico, ejerce un efecto terapéutico correspondiente al unirse a una célula que exprese un antígeno diana, por ejemplo, (1) mediante la incubación de células que expresen el antígeno diana de forma independiente con el agente de unión a la diana; (2) mediante la incubación de las células con un reactivo secundario que esté conjugado con el agente terapéutico y que se una específicamente al agente de unión a la diana; y (3) mediante el ensayo de las células en cuanto al correspondiente efecto terapéutico. Múltiples anticuerpos o derivados de anticuerpo se pueden evaluar fácilmente a través de dichos ensayos usando un reactivo secundario que se una específicamente a una región polipeptídica compartida por cada anticuerpo o derivado del mismo (por ejemplo, un anticuerpo anti-Ig). Por ejemplo, se puede identificar un mAb anti-CD70 que se une a CD70 y ejerce un efecto citotóxico cuando se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una auristatina tal como, por ejemplo, AFP, MMAF o MMAE) mediante un ensayo de inmunotoxicidad indirecto tal como, por ejemplo, el descrito por Chun *et al.*, 2003, *Suplement to Clinical Cancer Research*, vol. 9. En resumen, el agente citotóxico se conjuga con un anticuerpo secundario (por ejemplo, para mAb murinos, una IgG policlonal anti-murina); se incuban células que expresan CD70 con el anticuerpo primario como con el secundario conjugado con el agente citotóxico (por ejemplo, en placas de 96 pocillos, usando sobrenadante de hibridoma para el anticuerpo primario); y se evalúa la citotoxicidad dependiente del anticuerpo primario en un ensayo de citotoxicidad convencional (por ejemplo, un ensayo de viabilidad celular MTT).

Los anticuerpos y derivados de los mismos se pueden producir mediante métodos conocidos en la técnica para la síntesis de proteínas, normalmente, por ejemplo, mediante técnicas de expresión recombinante. La expresión recombinante de un anticuerpo o derivado del mismo que se une al antígeno diana, normalmente, incluye la construcción de un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o derivado del mismo. Un vector para la producción de la molécula de proteína se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas conocidas en la materia. Se pueden usar técnicas convencionales tales como, por ejemplo, las descritas en Sambrook y Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., III ed., 2001); Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., II ed., 1989); "Short Protocols in Molecular

Biology" (Ausubel *et al.*, John Wiley and Sons, Nueva York, IV ed., 1999); y Glick y Pasternak, "Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA" (ASM Press, Washington, D.C., II ed., 1998) para los métodos de ácidos nucleicos recombinantes, síntesis de ácidos nucleicos, cultivo celular, incorporación de transgenes y expresión de proteínas recombinantes.

Por ejemplo, para la expresión recombinante de un anticuerpo, un vector de expresión puede codificar una cadena pesada o ligera del mismo, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, unido operativamente a un promotor. Un vector de expresión puede incluir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO 86/05807 y WO 89/01036; y la patente de EE.UU. N° 5.122.464), y el dominio variable del anticuerpo se puede clonar en dicho vector para la expresión de la cadena pesada o ligera completa. El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales, y las células transfectadas se cultivan entonces mediante técnicas convencionales para producir el anticuerpo. En realizaciones típicas para la expresión de anticuerpos de doble cadena, se pueden coexpresar vectores que codifican tanto la cadena pesada como la ligera en la célula huésped para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina.

Se puede usar una variedad de sistemas de vectores de expresión en huéspedes procariotas y eucariotas para expresar un anticuerpo o derivado del mismo. Por lo general, las células eucariotas, en particular, para las moléculas de anticuerpos recombinantes enteras, se usan para la expresión de la proteína recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), en combinación con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano, es un sistema de expresión eficaz para la producción de anticuerpos y derivados de los mismos (véase, por ejemplo, Foecking *et al.*, 1986, *Gene* 45: 101; Cockett *et al.*, 1990, *Bio/Technology* 8: 2).

Otros sistemas de expresión en huéspedes incluyen, por ejemplo, sistemas de expresión basados en plásmidos en células bacterianas (véase, por ejemplo, Ruther *et al.*, 1983, *EMBO* 1,2:1791; Inouye e Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509); sistemas de insectos tales como, por ejemplo, el uso del vector de expresión del virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) en células de *Spodoptera frugiperda*; y sistemas de expresión basados en virus en células de mamíferos, tales como, por ejemplo, los sistemas basados en adenovirus (véase, por ejemplo, Logan y Shenk, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 81: 355-359; Bittner *et al.*, 1987, *Methods Enzymol.* 153: 51-544).

Además, se puede seleccionar una cepa de célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Se pueden seleccionar las líneas celulares o los sistemas hospedadores apropiados para asegurar la correcta modificación y procesamiento (por ejemplo, glucosilación, fosforilación y escisión) de la proteína expresada. Con este fin, se pueden usar células huésped eucarióticas que posean la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del producto transcrito primario y del producto génico. Dichas células huésped de mamífero incluyen, por ejemplo, CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3 y W138.

Por lo general, se usa un sistema de expresión estable para la producción a largo plazo, y de alto rendimiento, del anticuerpo recombinante o del derivado del mismo u otro agente de unión a la diana. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable el anticuerpo o derivado del mismo se pueden diseñar por ingeniería genética mediante la transformación de células huésped con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras y potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación) y un marcador seleccionable, seguido por el crecimiento de las células transformadas en un medio selectivo. El marcador seleccionable confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el ADN en sus cromosomas y crezcan para formar focos que, a su vez, puedan clonarse y expandirse en líneas celulares. Se puede usar una serie de sistemas de selección, incluyendo, por ejemplo, genes de la timidina quinasa del virus herpes simplex, hipoxantinoguanina fosforribosiltransferasa y adenina fosforribosiltransferasa, que se pueden emplear en células tk⁻, hgprt⁻ o aprt⁻, respectivamente. También, se puede usar la resistencia a los metabolitos como la base de la selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato; gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico; neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418; e hyg^r, que confiere resistencia a la higromicina. Se pueden aplicar rutinariamente los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante para seleccionar el clon recombinante deseado, y dichos métodos se describen, por ejemplo, en "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel *et al.* eds., John Wiley and Sons, N.Y., 1993); Kriegler, "Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual" (Stockton Press, N.Y., 1990); "Current Protocols in Human Genetics" (Drapoli *et al.* eds., John Wiley and Sons, N.Y., 1994, Capítulos 12 y 13); y Colberre-Garapin *et al.*, 1981, *J. Mol. Biol.* 150:1.

Los niveles de expresión de un anticuerpo o derivado se pueden aumentar mediante la amplificación de vectores. (Véase, en general, por ejemplo, Bebbington y Hentschel, "The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning", Vol. 3 (Academic Press, Nueva York, 1987). Cuando un marcador del sistema vectorial que expresa un anticuerpo o un derivado del mismo es amplificable, un aumento en el nivel de inhibidor presente en los medios de cultivo de células huésped seleccionará células huésped que tengan un mayor número de copias de un gen marcador que confiera resistencia al inhibidor. También se

aumentará el número de copias de un gen de anticuerpo asociado, aumentando así la expresión del anticuerpo o derivado del mismo (véase Crouse *et al.*, 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3: 257).

5 Cuando el anticuerpo comprende tanto una cadena pesada como una cadena ligera o derivados de las mismas, la célula huésped se puede contranfectar con dos vectores de expresión, codificando el primer vector la proteína de cadena pesada, y codificando el segundo vector la proteína de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permitan una expresión igual de proteínas de cadena pesada y ligera. Como alternativa, se puede usar un único vector que codifique, y sea capaz de expresar, ambas proteínas de cadena pesada y ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera normalmente se coloca antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (véase Proudfoot, 1986, *Nature* 322: 52; Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 77:2197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

15 Una vez que se ha producido un anticuerpo o derivado del mismo (por ejemplo, por un animal, síntesis química o expresión recombinante), se puede purificar mediante cualquier método adecuado para la purificación de proteínas, incluyendo, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico o cromatografía de afinidad (tal como, por ejemplo, cromatografía con Proteína A para la purificación de anticuerpos que tienen una región Fc intacta)), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Un anticuerpo o derivado del mismo se puede fusionar, por ejemplo, a una secuencia marcadora, tal como un péptido, para facilitar la purificación por cromatografía de afinidad. Las secuencias de aminoácidos marcadoras adecuadas incluyen, por ejemplo, un péptido de hexa-histidina, tal como el marcador proporcionado en un vector pQE (QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA, 91311) y el marcador "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson *et al.*, 1984, *Cell* 37: 767) y el marcador "flag".

25 Una vez que se produce un anticuerpo o derivado del mismo, su capacidad para ejercer un efecto citostático o citotóxico sobre las células que expresan el cáncer o un efecto inmunomodulador sobre una célula inmune se determina mediante los métodos descritos más adelante o como se conoce en la técnica.

30 Para reducir al mínimo la actividad del anticuerpo hacia las células diana (por ejemplo, células inmunes o células cancerosas), se puede usar un anticuerpo que se una específicamente al antígeno diana unido a la membrana celular, pero no al antígeno soluble, de manera que el anticuerpo se concentre en la superficie celular de la célula diana.

35 Por lo general, el agente de unión a la diana (por ejemplo, anticuerpo o derivado) está sustancialmente purificado (por ejemplo, sustancialmente exento de sustancias que limiten su efecto o produzcan efectos secundarios no deseados). En algunas realizaciones, el agente de unión a la diana es al menos aproximadamente un 40 % puro, al menos aproximadamente un 50 % puro o al menos aproximadamente un 60 % puro. En algunas realizaciones, el agente de unión a la diana tiene una pureza de al menos aproximadamente el 60-65 %, 65-70 %, 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 %, 90-95 % o 95-98 %. En algunas realizaciones, el agente de unión a la diana tiene una pureza de aproximadamente el 99 %.

III. Otros agentes de unión a la diana

45 Otros agentes de unión a la diana incluyen proteínas de fusión (es decir, proteínas que están fusionadas recombinantemente o conjugadas químicamente, incluyendo la conjugación tanto covalente como no covalente) a proteínas heterólogas (de normalmente al menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o al menos 100 aminoácidos). Dichos agentes de unión a la diana pueden incluir una parte que se una al antígeno diana y un dominio Fc de inmunoglobulina (Ig) variante o un equivalente funcional del mismo. Como se usa en el presente documento, un equivalente funcional de un dominio Fc de Ig se une a un receptor Fc en una célula inmune con actividad fagocítica o lítica o mediante la unión de uno o varios dominios efectores Fc a los componentes del sistema del complemento. Una variante de un equivalente funcional de dominio Fc de Ig presenta una unión reducida a un receptor Fc γ , como se describe en mayor profundidad en el presente documento. No es necesario que la proteína de fusión esté directamente ligada, sino que puede estarlo a través de secuencias enlazadoras.

55 Por ejemplo, se puede producir un agente de unión a la diana de forma recombinante mediante la fusión de la región de codificación de una o más de las CDR o la región variable de un anticuerpo en marco con una secuencia que codifique una proteína heteróloga. La proteína heteróloga puede incluir, por ejemplo, un dominio Fc de Ig variante, una variante de un equivalente funcional del mismo u otro dominio funcional para proporcionar una o más de las siguientes características: promover la expresión estable; proporcionar un medio que facilite la expresión recombinante de alto rendimiento; proporcionar una actividad citostática, citotóxica o inmunomoduladora; y/o proporcionar un dominio de multimerización.

65 En algunas realizaciones, el agente de unión a la diana puede incluir una o más CDR de un anticuerpo que se una al antígeno diana, al menos una parte de una región Fc y presente unión reducida a un receptor Fc γ .

IV. Conjugados de anticuerpo y fármaco

Las composiciones útiles en el tratamiento de un cáncer que expresa un antígeno diana o un trastorno inmunológico comprenden conjugados de anticuerpo y fármaco (ADC) o derivados de ADC. Un "ADC", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo conjugado con un agente terapéutico. Un "derivado de ADC", como se usa en el presente documento, se refiere a un derivado de un anticuerpo conjugado con un agente terapéutico. Un "ADC" o "derivado de ADC" también incluyen otros agentes de unión que se unen a un antígeno diana, y comprenden al menos una parte de una región Fc conjugada con un agente terapéutico. En ciertas realizaciones, el ADC comprende un anticuerpo anti-CD70 (por ejemplo, mAb 1F6 o 2F2, o un fragmento o derivado del mismo, incluyendo, por ejemplo, una forma quimérica o humanizada del mismo). Los ADC o los derivados de ADC, como se describen en el presente documento, producen efectos clínicamente beneficiosos sobre las células que expresan el antígeno diana cuando se administran a un sujeto con un cáncer que expresa el antígeno diana o un trastorno inmunológico, por lo general, cuando se administran solos, pero también en combinación con otros agentes terapéuticos.

En realizaciones típicas, el anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, se conjuga con un agente citotóxico o inmunomodulador, de manera que el ADC o derivado de ADC resultante ejerce un efecto citotóxico o citostático sobre una célula cancerosa que exprese el antígeno diana, o un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador sobre una célula inmune (por ejemplo, un linfocito activado o una célula dendrítica) cuando es absorbido o interiorizado por la célula. Los restos particularmente adecuados para la conjugación con anticuerpos o derivados de anticuerpos, u otros agentes de unión, son agentes quimioterapéuticos, enzimas conversoras de profármacos, isótopos o compuestos radiactivos, o toxinas. Por ejemplo, un anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, pueden conjugarse con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico (véase más adelante), o una toxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida tal como, por ejemplo, abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina de la difteria). Los ejemplos de agentes adicionales que son útiles para la conjugación de las moléculas de anticuerpo se proporcionan más adelante.

En otras realizaciones, el anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, se conjuga con un enzima conversora de profármacos. La enzima conversora de profármacos puede fusionarse de forma recombinante con el anticuerpo o derivado del mismo, o conjugarse químicamente con el mismo usando métodos conocidos. Los ejemplos de enzimas conversoras de profármacos son carboxipeptidasa G2, β -glucuronidasa, penicilina-V-amidasa, penicilina-G-amidasa, β -lactamasa, β -glucosidasa, nitrorreductasa y carboxipeptidasa A.

Las técnicas para conjugar agentes terapéuticos a las proteínas y, en particular, a anticuerpos, son bien conocidas. (Véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld *et al.* eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (Robinson *et al.* eds., Marcel Dekker, Inc., II ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera *et al.* eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin *et al.* eds., Academic Press, 1985); y Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. Véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 89/12624).

De acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, el ADC o derivado de ADC se interioriza y se acumula dentro de una célula que expresa el antígeno diana donde el ADC o derivado de ADC ejercen un efecto terapéutico (por ejemplo, un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador).

Por lo general, cuando se usa un anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, conjugado con un agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco o una enzima conversora de profármacos), el agente es preferentemente activo cuando es interiorizado por las células del cáncer que se va a tratar o por las células inmunes activadas (por ejemplo, linfocitos activados o células dendríticas). En otras realizaciones, el ADC o derivado de ADC no se interioriza, y el fármaco es eficaz para agotar o inhibir las células que expresan el antígeno diana mediante la unión a la membrana celular. En otras realizaciones más, el ADC o derivados de ADC se pueden dirigir a moléculas biológicas en una célula (por ejemplo, un agente inflamatorio) y acumularse en las células o células adyacentes que secretan o se unen a la molécula biológica, donde el agente terapéutico ejerce un efecto (por ejemplo., un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador).

Para reducir al mínimo la actividad del agente terapéutico fuera de las células inmunes activadas o de las células que expresan el antígeno diana, se puede usar un anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, que se une específicamente al antígeno diana unido a la membrana celular, pero no a un antígeno diana soluble, de modo que el agente terapéutico se concentre en la superficie celular de la célula inmune activada o de la célula cancerosa que expresa el antígeno diana. Como alternativa, en una realización más típica, el agente terapéutico se conjuga de una manera que reduce su actividad a menos que se escinda del anticuerpo o derivado del mismo, u otra agente de unión (por ejemplo, por hidrólisis o por un agente de escisión). En dichas realizaciones, el agente terapéutico se une al anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, con un enlazador escindible que es sensible a la escisión en el medio intracelular de la célula inmune activada o de la célula cancerosa que expresa el antígeno diana.

pero no es sustancialmente sensible al medio extracelular, de manera que el conjugado se escinde del anticuerpo o del derivado del mismo, o de otro agente de unión, cuando es interiorizado por la célula inmune activada o la célula cancerosa que expresa el antígeno diana (por ejemplo, en el entorno endosomal o, por ejemplo, en virtud de la sensibilidad al pH o de la sensibilidad de la proteasa, en el entorno lisosomal o en una caveola).

Además, en ciertas realizaciones, el ADC o el derivado de ADC comprende un agente terapéutico que se carga con respecto a la membrana plasmática, reduciendo al mínimo de este modo la capacidad del agente para atravesar la membrana plasmática una vez interiorizado por una célula. Como se usa en el presente documento, un "agente cargado" significa un agente que (a) está polarizado, de manera que una región del agente tiene una carga con respecto a la membrana plasmática; o (b) tiene una carga neta con respecto a la membrana plasmática.

Por lo general, el ADC o derivado de ADC está sustancialmente purificado (por ejemplo, sustancialmente exento de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). En ciertas realizaciones específicas, el ADC o derivado de ADC tiene una pureza del 40 %, más normalmente de aproximadamente el 50 %, y lo más normalmente de aproximadamente el 60 %. En otras realizaciones específicas, el ADC o derivado de ADC tiene una pureza de al menos aproximadamente el 60-65 %, 65-70 %, 70-75 %, 75-80 %, 80-85 %, 85-90 %, 90-95 % o 95-98 %. En otra realización específica, el ADC o derivado de ADC tiene una pureza de aproximadamente el 99 %.

A. enlazadores

Por lo general, el ADC o derivado de ADC comprenden una región enlazadora entre el agente terapéutico y el anticuerpo o agente del mismo, u otro agente de unión. Como se ha indicado anteriormente, en realizaciones típicas, el enlazador es escindible en condiciones intracelulares, de modo que la escisión del enlazador libera el agente terapéutico del anticuerpo en el medio intracelular.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, el enlazador es escindible por un agente de escisión que está presente en el medio intracelular (por ejemplo, dentro de un lisosoma o un endosoma o una caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador de peptidilo que sea escindido por una peptidasa intracelular o una enzima proteasa, incluyendo, pero sin limitación, una proteasa lisosomal o endosomal. Por lo general, el enlazador de peptidilo es al menos de dos aminoácidos de longitud o al menos de tres aminoácidos de longitud. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D, y plasmina, siendo todas ellas conocidas por hidrolizar derivados de fármacos dipeptídicos generando la liberación del fármaco activo en el interior de las células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83: 67-123). Son más comunes los enlazadores de peptidilo que son escindibles por las enzimas que están presentes en las células que expresan CD70. Por ejemplo, se puede usar un enlazador de peptidilo que sea escindible por la proteasa catepsina-B dependiente del tiol, que se expresa a nivel muy alto en el tejido canceroso (por ejemplo, un enlazador Phe-Leu o Gly-Phe-Leu-Gly). Otros de dichos enlazadores se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 6.214.345. En realizaciones específicas, el enlazador de peptidilo escindible por una proteasa intracelular es un enlazador Val-Cit o un enlazador Phe-Lys (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.214.345, que describe la síntesis de doxorrubicina con el enlazador val-cit). Una ventaja de usar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente normalmente se atenúa cuando se conjuga y las estabilidades en suero de los conjugados son generalmente elevadas.

En otras realizaciones, el enlazador escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Por lo general, el enlazador sensible al pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, se puede usar un enlazador lábil en medio ácido que es hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida *cis*-aconítica, ortoéster, acetal, cetel, o similares). (Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutic* 83: 67-123; Neville *et al.*, 1989, *Biol. Chem.* 264: 14.653-14.661). Dichos enlazadores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como las de la sangre, pero son inestables a pH inferior a 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas realizaciones, el enlazador hidrolizable es un enlazador de tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter unido al agente terapéutico a través de un enlace de acilhidrazona (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.622.929)).

En otras realizaciones más, el enlazador es escindible en condiciones reductoras (por ejemplo, un enlazador de disulfuro). Hay una variedad de enlazadores disulfuro conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los que se pueden formar usando SATA (*N*-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (*N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (*N*-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (*N*-succinimidil-oxycarbonilo- α -metil- α -(2-piridil-ditio)tolueno), SPDB y SMPT (véase, por ejemplo, Thorpe *et al.*, 1987, *Cancer Res.* 47: 5924-5931; Wawrzynczak *et al.*, en "Immunconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer" (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Véase también la patente de EE.UU. N° 4.880.935).

En otras realizaciones específicas más, el enlazador es un enlazador de malonato (Johnson *et al.*, 1995, *Anticancer Res.* 15: 1387-93), un enlazador de maleimidobenzofilo (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).

Por lo general, el enlazador no es sustancialmente sensible al medio extracelular. Como se usa en el presente documento, "no sustancialmente sensible al medio extracelular", en el contexto de un enlazador, significa que no

más de aproximadamente el 20 %, normalmente no más de aproximadamente el 15 %, más normalmente no más de aproximadamente el 10 % e incluso más normalmente no más de aproximadamente el 5 %, no más de aproximadamente el 3 % o no más de aproximadamente el 1 % de los enlazadores, en una muestra de ADC o derivado de ADC, se escinde cuando el ADC o derivado de ADC está presente en un ambiente extracelular (por ejemplo, en el plasma). Es posible determinar si un enlazador no es sustancialmente sensible al medio extracelular, por ejemplo, mediante la incubación independiente con plasma tanto (a) del ADC o derivado de ADC (la "muestra de ADC"), como (b) de una cantidad molar igual de anticuerpo no conjugado o derivado del mismo, o de otro agente de unión o agente terapéutico (la "muestra de control") durante un período de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y luego la comparación de la cantidad de anticuerpo o derivado del mismo u otro agente de unión o agente terapéutico no conjugado presente en la muestra de ADC con la presente en la muestra de control, medida, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto rendimiento.

En otras realizaciones no excluyentes entre sí, el enlazador promueve la interiorización celular. En ciertas realizaciones, el enlazador promueve la interiorización celular cuando se conjuga con el agente terapéutico (es decir, en el medio del resto de agente terapéutico-enlazador del ADC o derivado de ADC como se describe en el presente documento). En otras realizaciones más, el enlazador promueve la interiorización celular cuando se conjuga tanto con el agente terapéutico como con el anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, (es decir, en el medio del ADC o derivado de ADC como se describe en el presente documento).

En el documento WO 2004010957 titulado "Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, An Autoimmune Disease or an Infectious Disease", presentado el 31 de julio de 2003, la solicitud provisional de EE.UU. N° 60/400,403, titulada "Drug Conjugates and their use for treating cancer, an autoimmune disease or an infectious disease", presentada el 31 de julio de 2002, se describe una variedad de enlazadores que se puede usar con las presentes composiciones y métodos.

En ciertas realizaciones, la unidad enlazadora tiene la siguiente fórmula general:



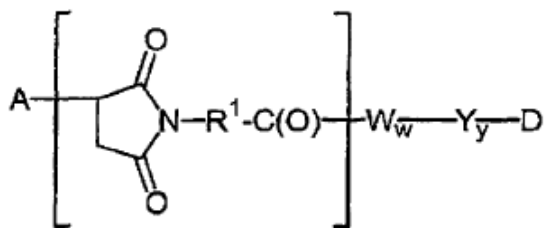
donde:

- T- es una unidad extensora
a es 0 o 1;
- cada -W- es, de manera independiente, una unidad de aminoácido;
w es, de manera independiente, un número entero que varía de 0 a 12;
- Y- es una unidad espaciadora; e
y es 0, 1 o 2.

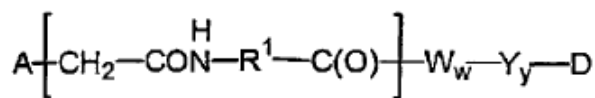
1. Unidad extensora

La unidad extensora (-T-), cuando está presente, une el anticuerpo o derivado del mismo, u otra unidad de agente de unión, a una unidad de aminoácidos (-W-). Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en un anticuerpo de unión al antígeno diana, bien de manera natural o mediante manipulación química incluyen, pero sin limitación, sulfhidrilo, amino, hidroxilo, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato, y carboxilo. Los grupos funcionales adecuados son sulfhidrilo y amino. Los grupos sulfhidrilo se pueden generar mediante la reducción de los enlaces disulfuro intramoleculares de un anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión. Como alternativa, los grupos sulfhidrilo se pueden generar mediante la reacción de un grupo amino de un resto de lisina de un anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otros reactivos de generación de sulfhidrilo. En realizaciones específicas, el anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión es un anticuerpo recombinante o derivado del mismo, u otro agente de unión, y está diseñado genéticamente para portar uno o más lisinas. En otras realizaciones, el anticuerpo recombinante o derivado del mismo, u otro agente de unión, está diseñado genéticamente para portar grupos sulfhidrilo adicionales, por ejemplo, cisteínas adicionales.

En ciertas realizaciones específicas, la unidad extensora forma un enlace con un átomo de azufre del anticuerpo o derivado del mismo, u otra unidad de agente de unión. El átomo de azufre se puede obtener de un grupo sulfhidrilo (-SH) de un anticuerpo reducido o derivado del mismo, u otro agente de unión (A). Las unidades extensoras representativas de dichas realizaciones se representan entre corchetes en las Fórmulas (Ia) y (Ib); véase más adelante), donde A-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente y R¹ se selecciona entre alquileo (C₁-C₁₀)-, -carbociclo (C₃-C₈)-, -O-(alquilo (C₁-C₈))-, -arileno-, -alquilen (C₁-C₁₀)-arileno-, -arilen-alquilen (C₁-C₁₀)-, -alquilen (C₁-C₁₀)-(carbociclo C₃-C₈)-, -(carbociclo (C₃-C₈))-alquilen (C₁-C₁₀)-, -heterociclo (C₃-C₈)-, -alquilen (C₁-C₁₀)-(heterociclo (C₃-C₈))-, -(heterociclo (C₃-C₈))-alquilen (C₁-C₁₀)-, -(CH₂CH₂O)- y -(CH₂CH₂O)-CH₂-; y r es un número entero que varía del 1-10.

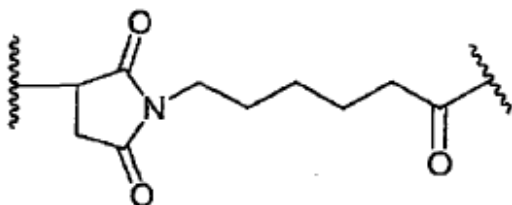


(Ia)



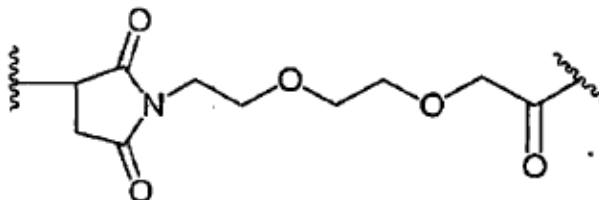
(Ib)

Una unidad extensora ilustrativa es la de fórmula (Ia) donde R^1 es $-(\text{CH}_2)_5-$.

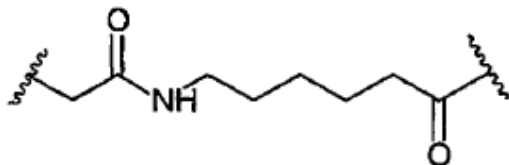


5

Otra unidad extensora ilustrativa es la de fórmula (Ia) donde R^1 es $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ y r es 2.



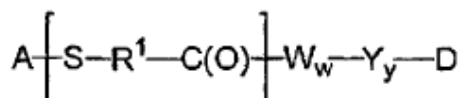
Otra unidad extensora ilustrativa más es la de fórmula (Ib) donde R^1 es $-(\text{CH}_2)_5-$.



10

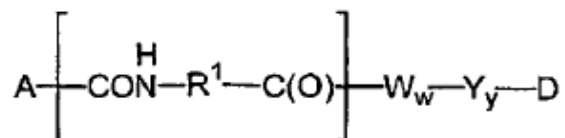
En otras ciertas realizaciones específicas, la unidad extensora está ligada al anticuerpo o derivado del mismo u otra unidad de agente de unión (A) a través de un enlace disulfuro entre un átomo de azufre del anticuerpo o derivado del mismo u otra unidad de agente de unión y un átomo de azufre de la unidad extensora. Una unidad extensora representativa de dicha realización se representa entre corchetes en la Fórmula (II), donde R^1 , A-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente.

15



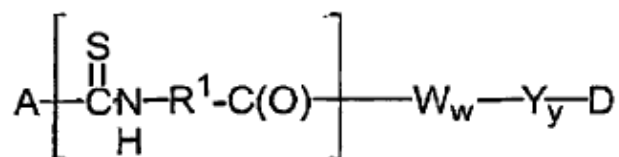
(II)

- En otras realizaciones específicas, el grupo reactivo del extensor contiene un sitio reactivo que puede ser reactivo hacia un grupo amino de un anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión. El grupo amino puede ser el de una arginina o una lisina. Los sitios reactivos amino adecuados incluyen, pero sin limitación, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las unidades extensoras representativas de dichas realizaciones se representan entre corchetes en las Fórmulas (IIIa) y (IIIb) donde R¹, A-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente;

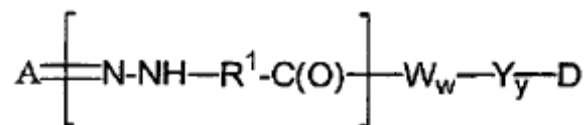


(IIIa)

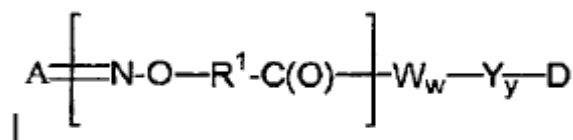
(IIIb)



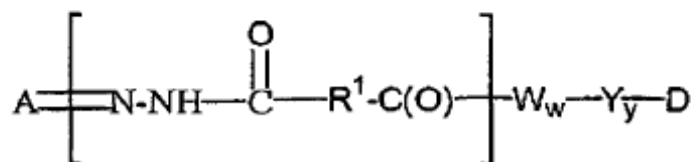
- En otro aspecto más, la función reactiva del extensor contiene un sitio reactivo que es reactivo con un grupo carbohidrato modificado que puede estar presente en un anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión. En una realización específica, el anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, se glucosila enzimáticamente para proporcionar un resto de carbohidrato. El carbohidrato se puede oxidar ligeramente con un reactivo tal como peryodato de sodio y la unidad de carbonilo resultante del carbohidrato oxidado se puede condensar con un extensor que contiene una funcionalidad tal como una hidrazida, una oxima, una amina reactiva, una hidrazina, una tiosemicarbazida, un carboxilato de hidrazina y una arilhidrazida tal como se describe por Kaneko *et al*, 1991, *Bioconjugate Chem* 2: 133-41. Las unidades extensoras representativas de dicha realización se representan entre corchetes en las Fórmulas (IVa)-(IVc), donde R¹, A-, -W-, -Y-, -D, w e y son como se han definido anteriormente.



(IVa)



(IVb)

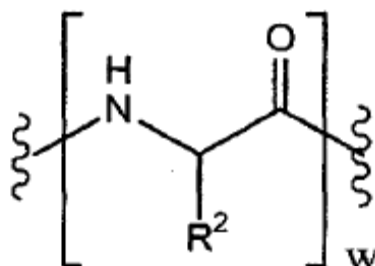


(IVc)

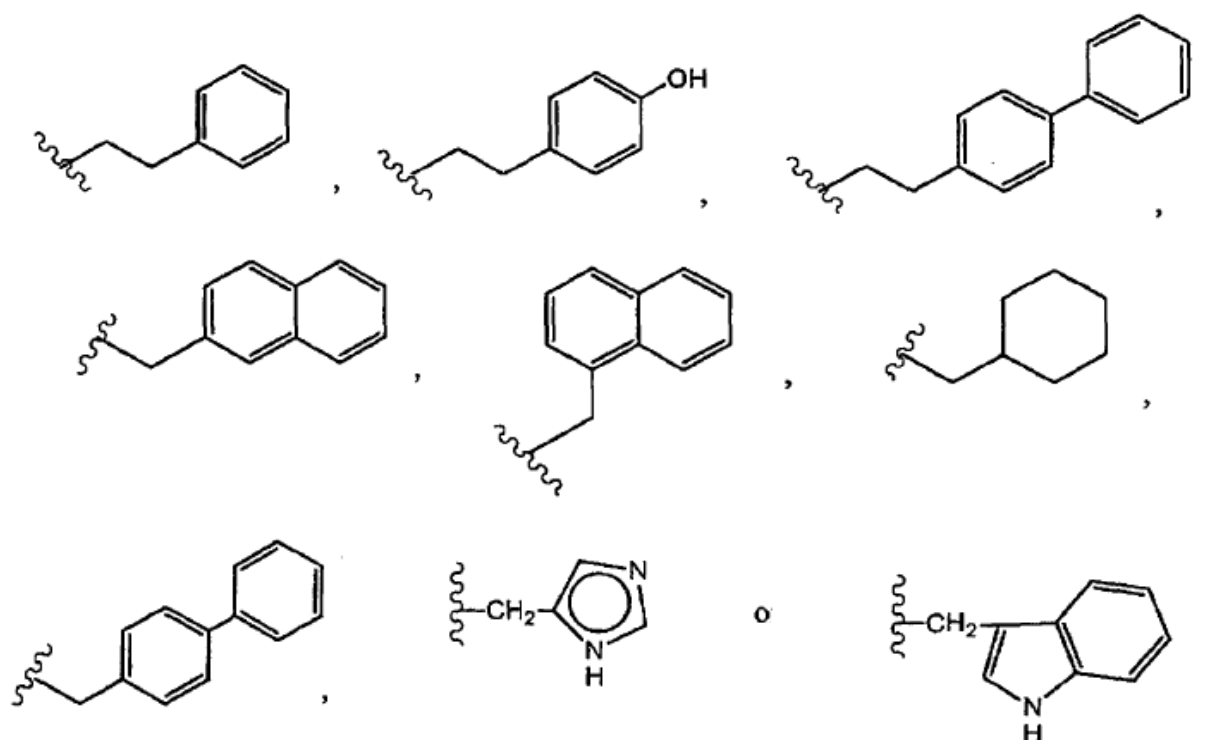
2. La Unidad de aminoácidos

- 5 La unidad de aminoácidos (-W-) une la unidad extensora (-T-) a la unidad espaciadora (-Y-), si la unidad espaciadora está presente, y une la unidad extensora al agente citotóxico o citostático (unidad de fármaco; D), si la unidad espaciadora está ausente.

- 10 -W- es una unidad de dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapeptídica. Cada unidad -W- tiene, de manera independiente, la fórmula indicada a continuación entre corchetes, y w es un número entero que varía de 2 a 12:



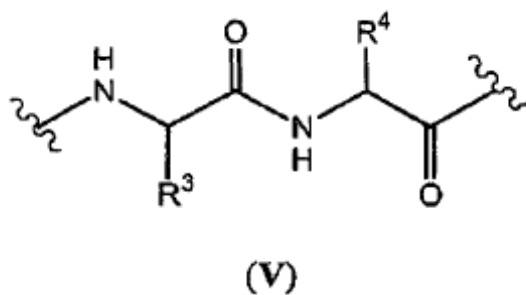
- 15 donde R² es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, *p*-hidroxibencilo, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-piridilmetilo-, 3-piridilmetilo-, 4-piridilmetilo-, fenilo, ciclohexilo.



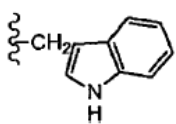
La unidad de aminoácidos de la unidad enlazadora puede ser escindida enzimáticamente por una enzima, incluyendo, pero sin limitación, una proteasa asociada al tumor para liberar la unidad de fármaco (-D) que se protona *in vivo* tras la liberación, proporcionando un fármaco citotóxico (D).

5

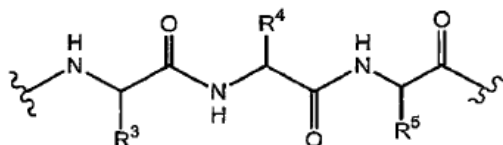
Las unidades W_w ilustrativas se representan por las fórmulas (V)-(VII):



donde R^3 y R^4 son como se establece a continuación:

R^3	R^4
Bencilo	$(CH_2)_4NH_2$;
Metilo	$(CH_2)_4NH_2$;
Isopropilo	$(CH_2)_4NH_2$;
Isopropilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$
Bencilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$
Isobutilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$
sec-butilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$
	$(CH_2)_3NHCONH_2$
Bencilo	metilo; y

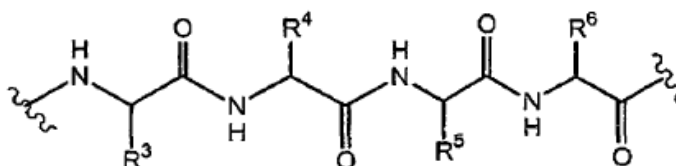
R ³	R ⁴
Bencilo	(CH ₂) ₃ NHC(=NH)NH ₂ ;



(VI)

donde R³, R⁴ y R⁵ son como se establece a continuación:

R ³	R ⁴	R ⁵
Bencilo	bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
Isopropilo	bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ; y
H	bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;



(VII)

5

donde R³, R⁴, R⁵ y R⁶ son como se establece a continuación:

R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
H	bencilo	isobutilo	H; y
metilo	isobutilo	metilo	Isobutilo.

10 Las unidades de aminoácidos adecuadas incluyen, pero sin limitación, unidades de fórmula (V) donde: R³ es bencilo y R⁴ es -(CH₂)₄NH₂; R³ es isopropilo y R⁴ es -(CH₂)₄NH₂; o R³ es isopropilo y R⁴ es -(CH₂)₃NHCONH₂. Otra unidad de aminoácidos adecuada es una unidad de fórmula (VI), donde: R³ es bencilo, R⁴ es bencilo y R⁵ es -(CH₂)₄NH₂.

15 Las unidades -W_w- se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la escisión enzimática por una proteasa asociada a un determinado tumor. Las unidades -W_w- adecuadas son aquellas cuya escisión está catalizada por las proteasas, la catepsina B, C y D, y plasmina.

En una realización, -W_w- es una unidad de dipéptido, tripéptido o tetrapéptido.

20 Cuando R², R³, R⁴, R⁵ o R⁶ es distinto de hidrógeno, el átomo de carbono al que R², R³, R⁴, R⁵ o R⁶ está unido es quiral.

Cada átomo de carbono al que R², R³, R⁴, R⁵ o R⁶ está unido está, de manera independiente, en configuración (S) o (R).

25 En una cierta realización, la unidad de aminoácidos es un dipéptido de fenilalanina-lisina (Phe-Lys o enlazador FK). En otra realización, la unidad de aminoácidos es un dipéptido de valina-citrulina (Val-Cit o enlazador VC).

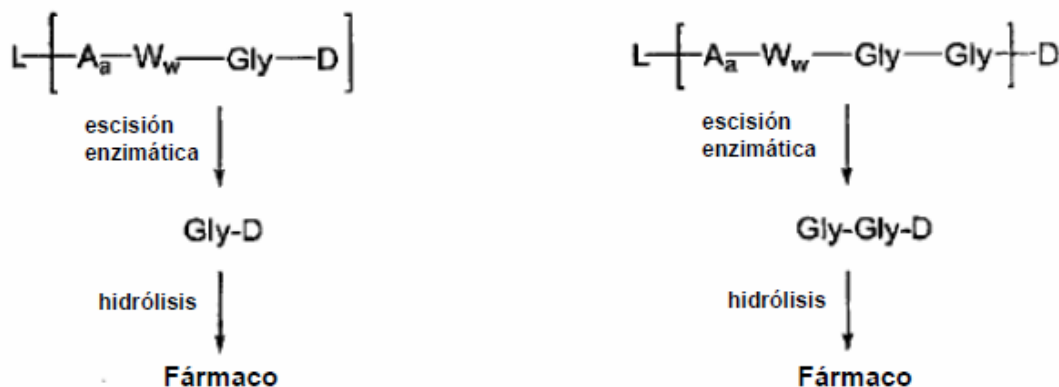
3. Unidad espaciadora

La unidad espaciadora (-Y-), cuando está presente, une una unidad de aminoácidos a la unidad de fármaco. Las unidades espaciadoras son de dos tipos generales: auto-inmolativas y no auto-inmolativas. Una unidad espaciadora no auto-inmolativa es aquella donde parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida a la unidad de fármaco tras la escisión enzimática de una unidad de aminoácidos del conjugado de anticuerpo-enlazador-fármaco o del compuesto fármaco-enlazador. Los ejemplos de una unidad espaciadora no auto-inmolativa incluyen, pero sin limitación, una unidad espaciadora de (glicina-glicina) y una unidad espaciadora de glicina (ambas representadas en el Esquema 1). Cuando un conjugado de anticuerpo-enlazador-fármaco que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina es sometido a la escisión enzimática por medio de una proteasa asociada a células tumorales, una proteasa asociada a células cancerosas o una proteasa asociada a linfocitos, un resto de glicina-glicina-fármaco o un resto de glicina-fármaco se escinde de A-T-W_w-. Para liberar el fármaco, se debe producir una reacción de hidrólisis independiente dentro de la célula diana para escindir el enlace de la unidad de glicina-fármaco.

En una realización típica, -Yy- es un *p*-aminobenciléter que puede estar sustituido con Q_m, donde Q es -alquilo (C₁-C₈), -alcoxi (C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero de 0-4.

Esquema 1

En una realización, una unidad espaciadora no auto-inmolativa (-Y-) es -Gly-Gly-.

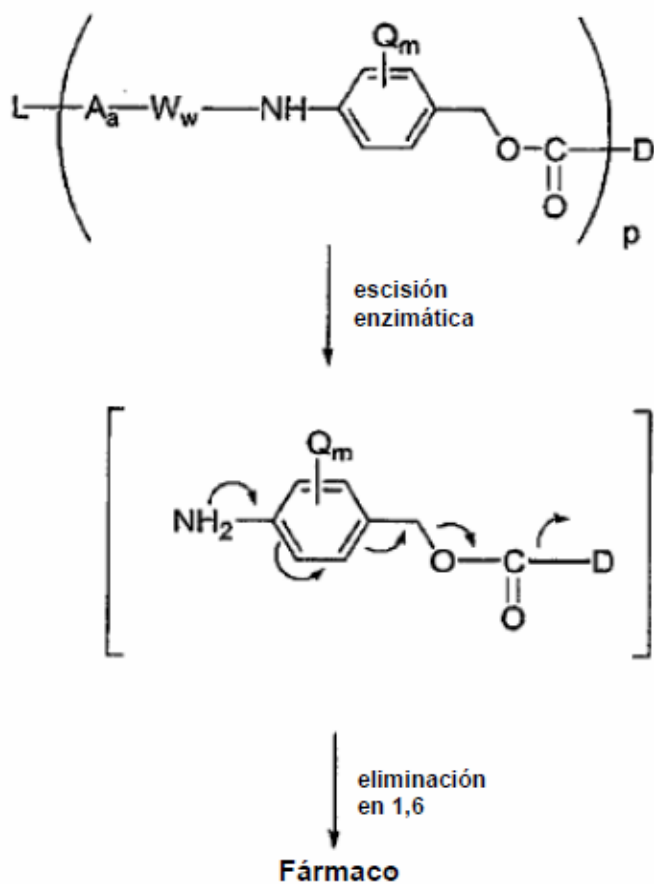


En otra realización, una unidad espaciadora no auto-inmolativa (-Y-) es -Gly-.

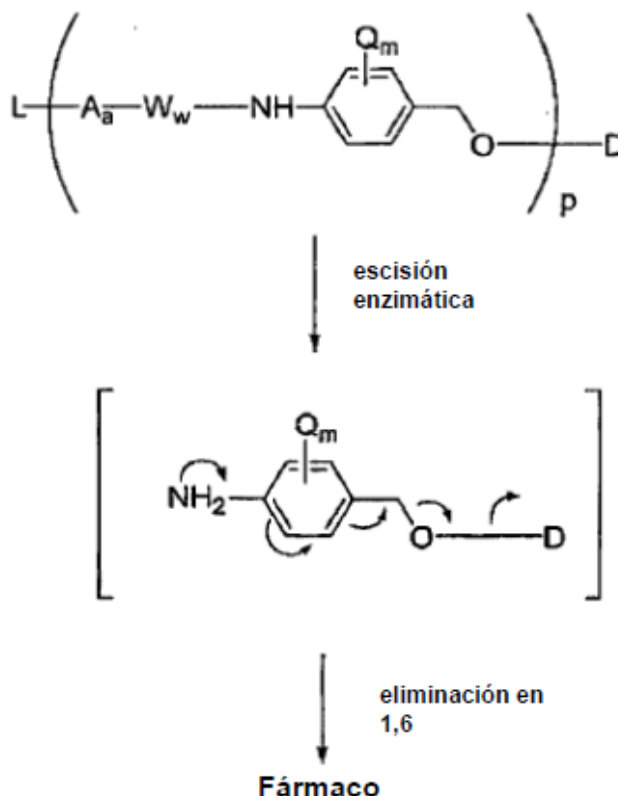
En una realización, el compuesto de fármaco-enlazador o un conjugado de anticuerpo anti-CD70-enlazador-fármaco carece de una unidad espaciadora (y = 0).

Como alternativa, un conjugado de anticuerpo o derivado del mismo u otro agente de unión-enlazador-fármaco que contiene una unidad espaciadora auto-inmolativa puede liberar el fármaco (D) sin la necesidad de una etapa de hidrólisis separada. En dichas realizaciones, -Y- es una unidad de alcohol *p*-aminobencílico (PAB) que está ligada a -W_w- por medio del átomo de nitrógeno del grupo PAB y conectada directamente a -D por medio de un grupo carbonato, carbamato o éter (Esquema 2 y Esquema 3).

Esquema 2



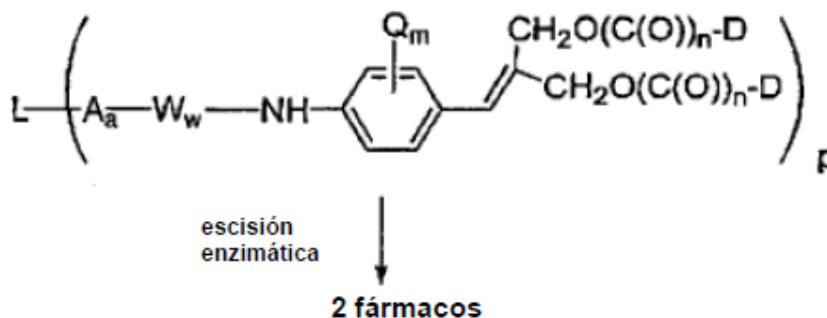
donde Q es -alquilo ($C_1 - C_8$), -alcoxi ($C_1 - C_8$), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; y p es un número entero que varía de 1-20.

Esquema 3

donde Q es -alquilo (C₁-C₈), -alcoxi (C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; y p es un número entero que varía de 1-20.

5 Otros ejemplos de espaciadores auto-inmolativos incluyen, pero sin limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente equivalentes al grupo PAB, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (véase Hay *et al.*, 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 2237 para los ejemplos) y *orto*- o *para*-aminobencilacetales. Se pueden usar espaciadores que se someten fácilmente a ciclación tras la hidrólisis del enlace de amida, tales como amidas de
 10 ácidos 4-aminobutíricos sustituidos y no sustituidos (Rodrigues *et al.*, 1995, *Chemistry Biology* 2: 223), sistemas de anillos biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] apropiadamente sustituidos (Storm *et al.*, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) y amidas de ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.* 55: 5867). La eliminación de fármacos que contienen aminas que están sustituidos en la posición α de glicina (Kingsbury, *et al.*, 1984, *J. Med. Chem.* 27: 1447) también son ejemplos de estrategias espaciadoras auto-inmolativas que se pueden aplicar en los conjugados
 15 de anticuerpo-enlazador-fármaco.

En una realización alternativa, la unidad espaciadora es una unidad de bis(hidroximetil)estireno (BHMS) ramificada (Esquema 4), que se puede usar para incorporar fármacos adicionales.

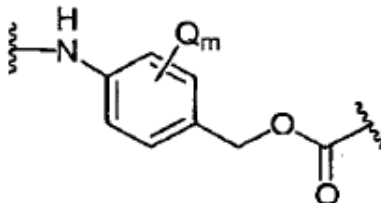
Esquema 4

donde Q es -alquilo (C₁-C₈), -alcoxi (C₁-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero que varía de 0-4; n es 0 o 1; y p es un número entero que varía de 1-20.

En una realización, los dos restos -D son iguales.

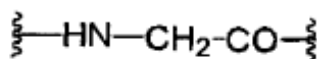
En otra realización, los dos restos -D son diferentes.

- 5 Las unidades espaciadoras (-Y-) típicas están representadas por las fórmulas (VIII)-(X):



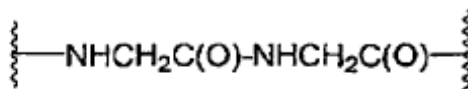
(VIII)

donde Q es -alquilo (C₁-C₈), -alcoxi (C₁-C₈), -halógeno, - nitro o -ciano; y m es un número entero que varía de 0-4;



(IX);

10 y



(X)

B. Agentes terapéuticos

- 15 De acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, se puede usar como agente terapéutico cualquier agente que ejerza un efecto terapéutico sobre las células cancerosas o células inmunes activadas para la conjugación a un anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión. (Véase, por ejemplo, el documento WO 2004/010957, "Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, An Autoimmune Disease or an Infectious Disease" (*supra*) y la solicitud provisional de EE.UU. N° 60/400.403 (*supra*)). Por lo general, el agente terapéutico es un agente citotóxico o inmunosupresor.

- 20 Las clases útiles de agentes citotóxicos o inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, agentes de unión al surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino tales como *cis*-platino, mono(platino), bis(platino) y complejos de trinucleares de platino y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de quimioterapia, 25 duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinos, compuestos de preformación, antimetabolitos de purina, puomicinas, sensibilizadores de la radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa, alcaloides de la vinca o similares.

- 30 Los agentes citotóxicos o inmunomoduladores individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramicina (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, butionina sulfoximina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citidina, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (previamente actinomicina), daunorubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluordesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gramicidina D, hidroxurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, 35 mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbina, estreptozotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tiotepa, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

- 40 En algunas realizaciones típicas, el agente terapéutico es un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE), agentes de unión al surco menor del ADN (por ejemplo, enedinas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y

docetaxel), puomicinas, alcaloides de la vinca, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxorrubicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorrubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobina y mitoxantrona.

5 En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico convencional tal como, por ejemplo, doxorrubicina, paclitaxel, melfalán, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. Además, se pueden ligar agentes potentes tales como análogos de CC-1065, caliqueamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina y palitoxina los anticuerpos o derivados de los mismos.

10 En realizaciones específicas, el agente citotóxico o citostático es auristatina E (también conocida en la técnica como dolastatina-10) o un derivado de la misma. Por lo general, el derivado de auristatina E es, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, la auristatina E puede hacerse reaccionar con ácido paraacetil-benzoico o ácido benzoilvalérico, produciéndose AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados típicos de auristatina incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y estructura de la auristatina E y sus derivados se describen en la solicitud de patente de EE.UU. N° 09/845.786 (publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 20030083263) y 10/001.191; solicitud de patente internacional N° PCT/US03/24209, solicitud de patente internacional N° PCT/US02/13435, y las patentes de EE.UU. N° 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

20 En realizaciones específicas, el agente citotóxico es un agente de unión al surco menor del ADN. (Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.130.237). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el agente de unión al surco menor es un compuesto de CBI. En otras realizaciones, el agente de unión al surco menor es una enediína (por ejemplo, caliqueamicina).

25 En ciertas realizaciones, el ADC o derivado de ADC comprende un agente antitubulina. Los ejemplos de agentes anti-tubulina incluyen, pero sin limitación, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina) y dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de baccatina, análogos de taxano (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcemid, estramustina, criptofisinas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida y eleuterobina.

30 En ciertas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes antitubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide es maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chan *et al*, 1992, *Cancer Res*, 52: 127- 131).

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico no es un radioisótopo.

40 En ciertas realizaciones, el agente citotóxico o inmunomodulador es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purina (por ejemplo, azotioquina o micofenolato de mofetilo), un inhibidor de la reductasa de dihidrofolato (por ejemplo, metotrexato), aciclovir, ganciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavirina, azidotimidina, arabinósido de citidina, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, poscarnet o trifluridina.

45 En otras realizaciones, el agente citotóxico o inmunomodulador es tacrolimus, ciclosporina o rapamicina. En realizaciones adicionales, el agente citotóxico se aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, bexaroteno, bexaroteno, calusterona, capecitabina, celecoxib, cladribina, darbepoetina α , denileucina diftotox, dexrazoxano, propionato de dromostanolona, epirubicina, epoetina α , estramustina, exemestano, Filgrastim, floxuridina, fludarabina, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, goserelina, idarubicina, ifosfamida, mesilato de imatmib, interferón α -2a, irinotecán, letrozol, leucovorina, levamisol, mecloretamina o mostaza de nitrógeno, megestrol, mesna, metotrexato, metoxsalen, mitomicina C, mitotano, fenpropionato de nandrolona, oprelvekin, oxaliplatino, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pentostatina, pipobromán, plicamicina, porfímero sódico, procarbazona, quinacrina, rasburicasa, Rituximab, Sargramostim, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, teniposida, testolactona, tioguanina, toremifeno, Tositumomab, trastuzumab, tretinoína, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina y zoledronato.

55 En realizaciones adicionales, el fármaco es un anticuerpo monoclonal humanizado contra HER2, RITUXAN (rituximab; Genentech; un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico); OVAREX (AltaRex Corporation, MA); PANOREX (Glaxo Wellcome, NC; un anticuerpo IgG2a murino); Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY; un anticuerpo quimérico IgG anti-EGFR); Vitaxin (MedImmune, Inc., MD; Campath I/H (Leukosite, MA; un anticuerpo IgG1 humanizado); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA; un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ; un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado); Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA; un anticuerpo anti-HLA-DR humanizado); Oncolym (Techniclone, Inc., CA; un anticuerpo anti-HLA-Dr10 murino radiomarcado); Allomune (BioTransplant, CA; un mAb anti-CD2 humanizado); Avastin (Genentech, Inc., CA; un anticuerpo humanizado anti-VEGF); Epratuzumab (Immunomedics, Inc., NJ y Amgen, CA; un anticuerpo anti-CD22); y CEAcide (Immunomedics, NJ; un anticuerpo anti-CEA humanizado).

Otros anticuerpos adecuados incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos contra los siguientes antígenos: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis Y, Lewis X, α fetoproteína, CA 242, fosfatasa alcalina placentaria, antígeno específico de la próstata, fosfatasa ácida prostática, factor de crecimiento epidérmico, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, receptor anti-transferrina, p97, MUC1-KLH, CEA, gp100, MART1, antígeno específico de la próstata, receptor IL-2, CD20, CD52, CD33, CD22, gonadotropina coriónica humana, CD38, CD40, mucina, P21, MPG y producto oncogénico Neu.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico es un agente inmunomodulador. El agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, ganciclovir, etanercept, tacrolimus, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato de mofetilo o metotrexato. Como alternativa, el agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, un glucocorticoide (por ejemplo, cortisol o aldosterona) o un análogo de glucocorticoides (por ejemplo, prednisona o dexametasona).

En ciertas realizaciones típicas, el agente inmunomodulador es un agente antiinflamatorio, tal como derivados arilcarboxílicos, derivados que contiene pirazol, derivados de oxicam y derivados de ácido nicotínico. Las clases de agentes antiinflamatorios incluyen, por ejemplo, inhibidores de la ciclooxigenasa, inhibidores de 5-lipoxigenasa y antagonistas de los receptores de leucotrienos.

Los inhibidores de la ciclooxigenasa adecuados incluyen ácido meclofenámico, ácido mefenámico, carprofeno, diclofenac, diflunisal, fenbufeno, fenoprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, nabumetona, naproxeno, sulindac, tenoxicam, tolmetina y ácido acetilsalicílico.

Los inhibidores de lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores rédox (por ejemplo, derivados de catecol-butano, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), masoprocol, fenidona, lanopalén, indazolinonas, nafazatrom, benzofuranol, alquilhidroxilamina) e inhibidores no rédox (por ejemplo, hidroxitiazoles, metoxialquiltiazoles, benzopiranos y sus derivados, metoxitetrahidropirano, ácidos boswéllicos y derivados acetilados de ácidos boswéllicos, y ácidos quinolinometoxifenilacéticos sustituidos con radicales cicloalquilo), y precursores de los inhibidores rédox.

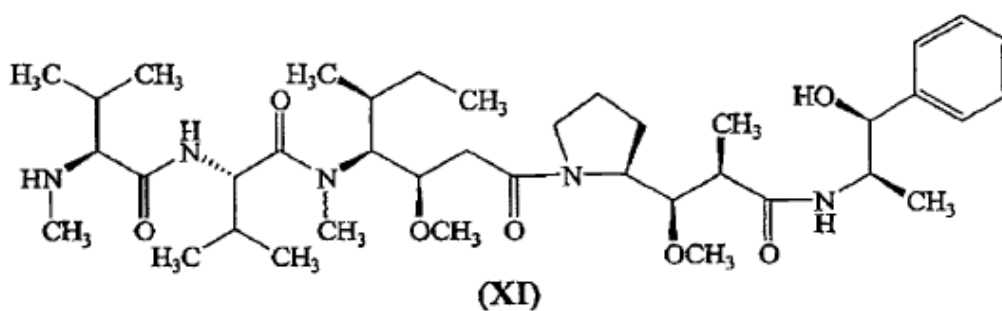
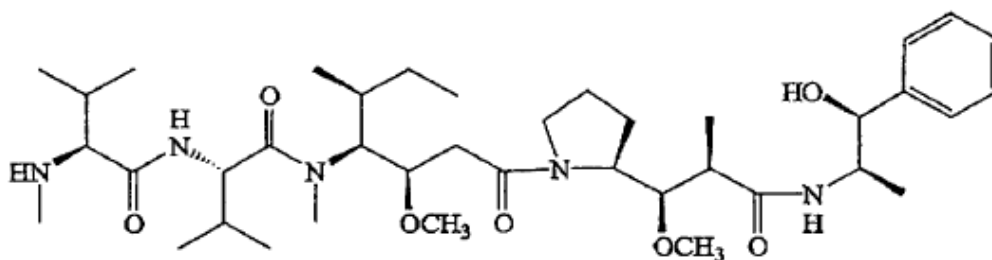
Otros inhibidores de la lipoxigenasa adecuados incluyen antioxidantes (por ejemplo, fenoles, propilgalato, flavonoides y/o sustratos de origen natural que contienen flavonoides, derivados hidroxilados de flavonas, flavonol, dihidroquercetina, luteolina, galangina, orobol, derivados de chalcona, 4,2',4'-trihidroxichalcona, *orto*-aminofenoles, N-hidroxiureas, benzofuranos, ebselen y especies que aumentan la actividad de las selenoenzimas reductoras), agentes quelantes de hierro (por ejemplo, ácidos hidroxámicos y derivados de los mismos, N-hidroxiureas, 2-bencil-1-naftol, catecoles, hidroxilaminas, carnosol trolox C, catecol, naftol, sulfasalazina, zileutón, ácido 5-hidroxi-antranílico y ácidos 4-(omega-arilalquil)fenilalcanoicos), compuestos que contienen imidazol (por ejemplo, quetoconazol e itraconazol), fenotiazinas y derivados de benzopirano.

Otros inhibidores de la lipoxigenasa adecuados más incluyen inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, ácido octadecatetraenoico, ácido eicosatetraenoico, ácido docosapentaenoico, ácido eicosahexaenoico y ácido docosahexaenoico y ésteres de los mismos, PGE1 (prostaglandina E1), PGA2 (prostaglandina A2), viprostol, ácido 15-monohidroxieicosatetraenoico, ácido 15-monohidroxi-eicosatrienoico y ácido 15-monohidroxieicosapentaenoico y leucotrienos B5, C5 y D5), compuestos de interferencia con los flujos de calcio, fenotiazinas, difenilbutilaminas, verapamil, fuscocina, curcumina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido 5,8,11,14-cicosatetraenoico (ETYA), hidroxifenilretinamida, lonapalen, esculina, dietilcarbamazina, fenantrolina, baicaleína, proxicromil, tioéteres, dialilsulfuro y di-(1-propenil)sulfuro.

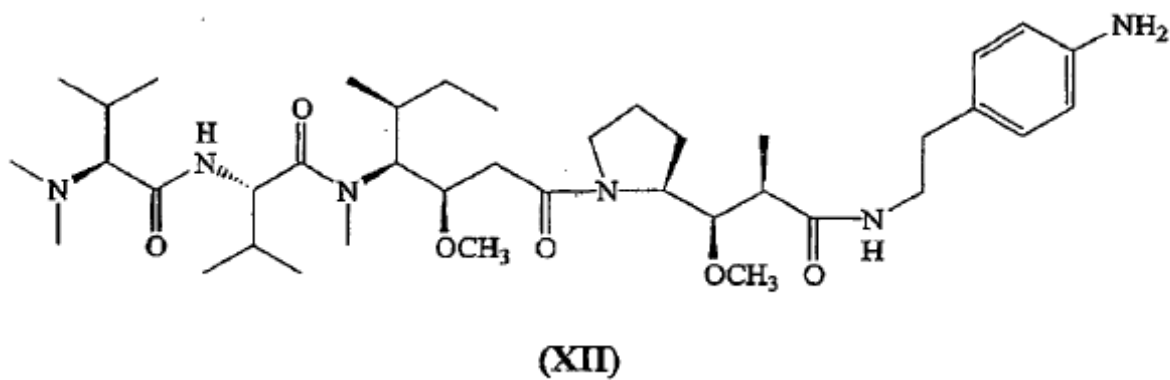
Los antagonistas de los receptores de leucotrienos incluyen calcitriol, ontazolast, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, ebselen, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingelheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitamo SM 15178, American Home Products WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck y Co. MK-591, Merck y Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG 14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SK&F-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 y Teijin TEI-1338.

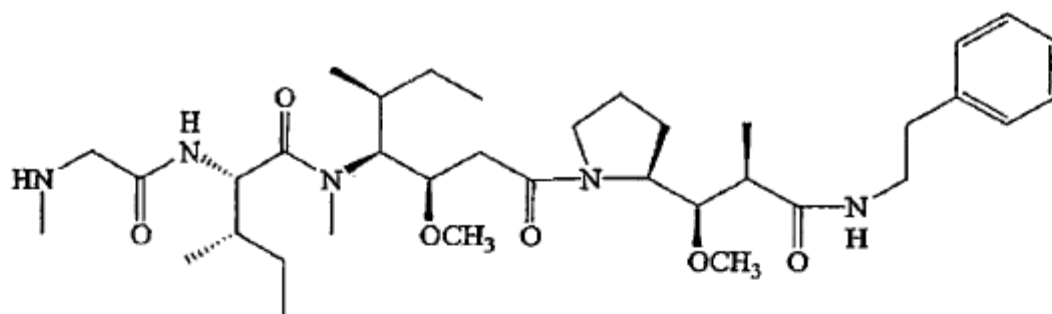
1. Fármacos de dolastatina

En ciertas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es una dolastatina. En realizaciones más específicas, la dolastatina es de la clase auristatina. Como se usa en el presente documento, el término dolastatina abarca auristatinas de origen natural y derivados no naturales, por ejemplo, MMAE. Por lo tanto, en una realización específica, el agente citotóxico o citostático es MMAE (Fórmula XI). En otra realización específica, el agente citotóxico o citostático es AFP (Fórmula XVI).

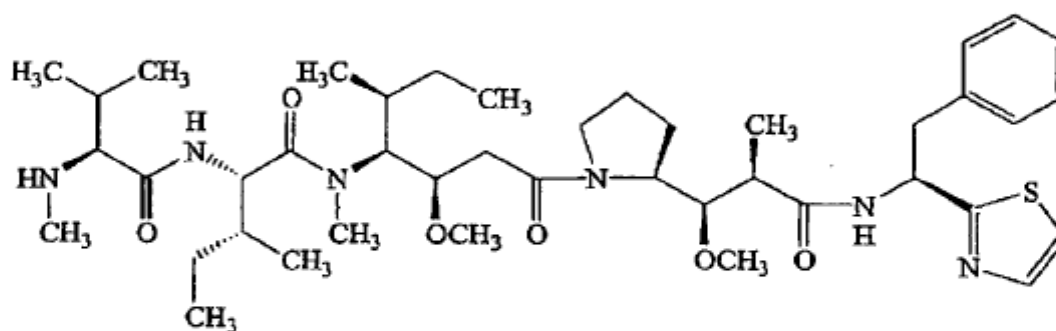


En ciertas realizaciones, el agente citotóxico o citostático es una dolastatina de fórmulas **XII-XXI**.

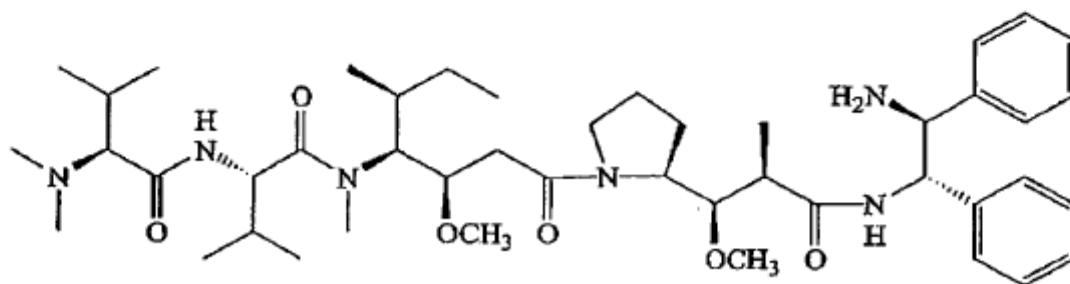




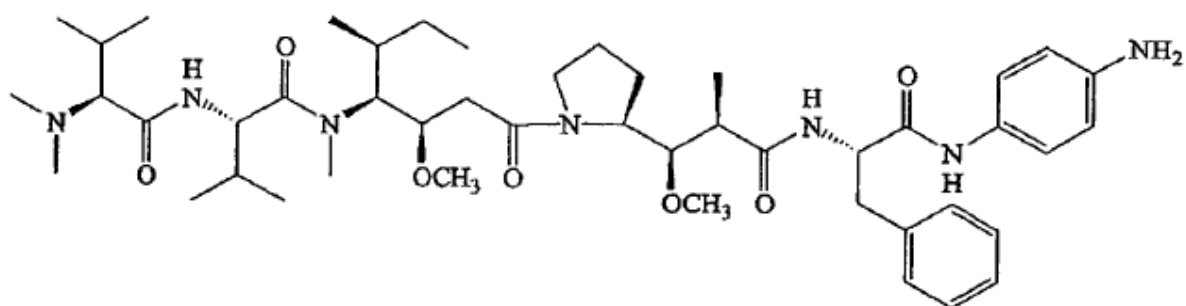
(XIII)

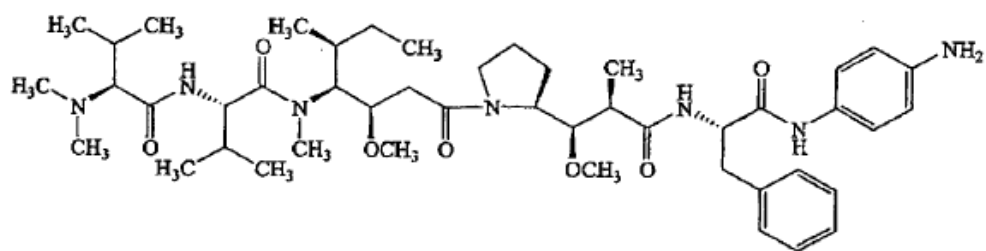


(XIV)

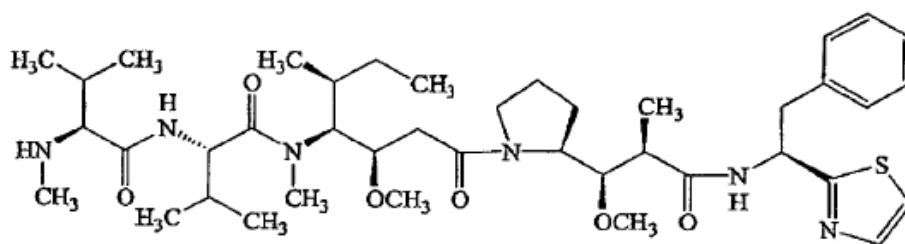


(XV)

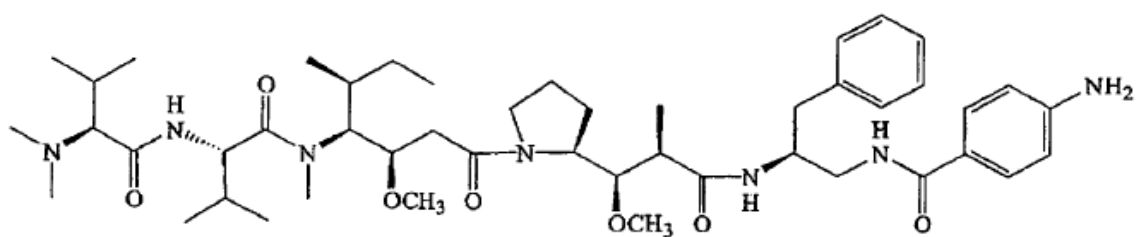




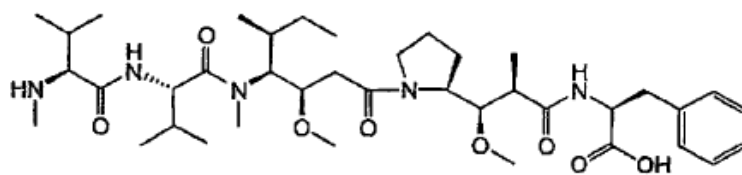
(XVI)



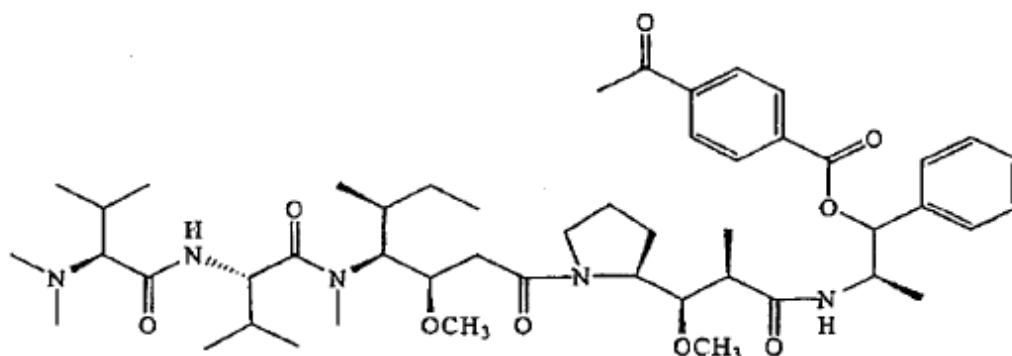
(XVII)



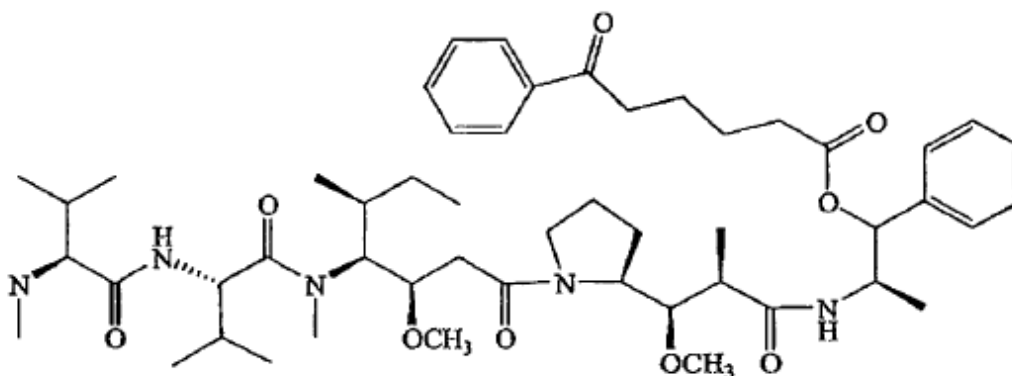
(XVIII)



(XIV)



(XX)



(XXI)

C. Formación de ADC y derivados de ADC

La generación de ADC y derivados de ADC se puede realizar mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia. En resumen, los ADC comprenden un anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, un fármaco y, opcionalmente, un enlazador que une el fármaco y el anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión. Hay una serie de diferentes reacciones disponibles para la unión covalente de los fármacos a los anticuerpos o derivados de los mismos, u otros agentes de unión. Esto a menudo se lleva a cabo mediante la reacción de los restos de aminoácido de la molécula, incluyendo los grupos amino de lisina, los grupos de ácido carboxílico libres de ácido glutámico y aspártico, los grupos sulfhidrido de cisteína y los diversos restos de los aminoácidos aromáticos. Uno de los métodos inespecíficos más comúnmente usados de unión covalente es la reacción de carbodiimida para unir un grupo carboxi (o amino) de un compuesto a los grupos amino (o carboxi) del anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión. Además, se han usado agentes bifuncionales tales como dialdehídos o imidoésteres para enlazar el grupo amino de un compuesto a grupos amino de la molécula. También se encuentra disponible para la unión de los fármacos a los anticuerpos la reacción de base de Schiff. Este método implica la oxidación con peryodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxilo, formando de este modo un aldehído que luego se hace reaccionar con el anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión. La unión se produce mediante la formación de una base de Schiff con grupos amino de la molécula. También se pueden usar isotiocianatos como agentes de acoplamiento para unir covalentemente fármacos a anticuerpos o derivados de los mismos u otros agentes de unión. Hay otras técnicas conocidas por el experto en la materia y que pertenecen al alcance de la presente invención. Los ejemplos no limitantes de dichas técnicas se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 5.665.358.; 5.643.573; y 5.556.623.

En algunas realizaciones, una región de unión (tal como un anticuerpo) se conjuga con un conjugado de enlazador-fármaco como se desvela en las solicitudes de EE.UU. publicadas N° 2006-0074008 o 2005-0238649 o la solicitud internacional publicada N° WO 05/084390. En algunas realizaciones, donde se introduce un resto de cisteína, se puede conjugar una región de unión a un conjugado de enlazador-fármaco como se desvela en la solicitud de patente de EE.UU. publicada N° 2007-092940 o Givol *et al*, 1965, *Proc. Natl. Acad. Sci* EE.UU. 53:676-84. En general, los enlaces disulfuro intercatenarios, y el/los resto/s de cisteína introducido/s del anticuerpo se reducen por

completo, seguido de la reoxidación parcial de los disulfuros intercatenarios (por ejemplo, con cobre, aire o ácido deshidroascórbico). Luego se puede conjugar el fármaco enlazador a los restos de cisteína introducidos.

En ciertas realizaciones, se hace reaccionar un producto intermedio, que es el precursor del enlazador, con el fármaco en condiciones apropiadas. En ciertas realizaciones, se usan grupos reactivos en el fármaco y/o el producto intermedio. Posteriormente, el producto de la reacción entre el fármaco y el producto intermedio, o el fármaco derivatizado, se hace reaccionar con el anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, en condiciones apropiadas.

V. Métodos para modificar anticuerpos y agentes de unión

Los anticuerpos de unión a la diana o derivados de los mismos, u otros agentes de unión, también pueden incluir análogos y derivados que estén modificados, por ejemplo, por eliminaciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo o agente de unión, o mediante unión covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicha unión covalente permita que el anticuerpo conserve su inmunoespecificidad de unión hacia el antígeno.

Por ejemplo, los derivados y análogos de los anticuerpos o derivados de los mismos, o de otros agentes de unión, incluyen los que se han modificado adicionalmente, por ejemplo, por glucosilación, desglucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a una unidad de anticuerpo celular u otra proteína, etc. Se puede llevar a cabo cualquiera de las numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitación, la escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica en presencia de tunicamicina, o similares. Además, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no naturales.

En realizaciones específicas, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo o derivado del mismo, o de otro agente de unión. (Véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. N° 2006/0003412 y 2006/0008882). Los derivados de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos se preparan introduciendo cambios en los nucleótidos apropiados del ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, eliminaciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de restos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de eliminación, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los cambios de aminoácidos también pueden alterar los procesos posteriores a la traducción del anticuerpo, tales como el cambio del número o de la posición de los sitios de glucosilación.

Un método útil para la identificación de ciertos restos o regiones del anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, que son ubicaciones favorables para la mutagénesis se denomina "mutagénesis mediante alanina" según lo descrito por Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085. En este caso, se identifica un resto o grupo de restos diana (por ejemplo, restos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se reemplaza por un aminoácido neutro o cargado negativamente (normalmente, alanina o polialanina) para afectar a la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Entonces, dichas ubicaciones de aminoácidos que muestran sensibilidad funcional hacia las sustituciones se perfeccionan introduciendo más u otros derivados en, o para, los sitios de sustitución. Por lo tanto, mientras que el sitio para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación en sí esté predeterminada. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, se realiza la mutagénesis mediante alanina o la mutagénesis aleatoria en el codón o región diana, y se exploran los derivados de anticuerpos expresados en busca de la actividad deseada.

Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales que varían en longitud desde un resto hasta polipéptidos que contienen cien o más restos, así como inserciones intrasecuencia de uno o varios restos de aminoácidos. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, con un resto metionilo N-terminal o el anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, fusionado a un polipéptido citotóxico.

Otro tipo de derivado es un derivado por sustitución de aminoácidos. Dichos derivados tienen al menos un resto de aminoácido en el anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, reemplazado por un resto diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan las modificaciones de las regiones marco.

Se realizan modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura de la cadena principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, como una configuración en lámina o helicoidal, (b) de la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) del volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;

- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

5

Las sustituciones de aminoácidos no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de dichas clases por otra clase.

Un tipo particular de derivado por sustitución implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, el/los derivado/s resultante/s seleccionado/s para un mayor desarrollo tendrá/n mejores propiedades biológicas con respecto al anticuerpo parental a partir del cual se ha/n generado. Una manera conveniente para generar dichos derivados por sustitución implica la maduración por afinidad usando la presentación en fagos. En resumen, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Los derivados de anticuerpos así generados se presentan de una manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Se explora la actividad biológica de los derivados presentados en fagos (por ejemplo, afinidad de unión). Para identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar una mutagénesis mediante alanina con el fin de identificar los restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o además, puede que beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo de antígeno-anticuerpo con el fin de identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos restos de contacto y restos vecinos son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en el presente documento. Una vez generados dichos derivados, se explora el grupo de derivados, pudiéndose seleccionar los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para su posterior desarrollo.

25

El anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, se modifica con respecto a la unión a uno o más receptores Fc γ (Fc γ R), por ejemplo, para reducir la unión a uno o más Fc γ R. Dicha modificación también puede provocar la reducción de la citotoxicidad mediada por células dependiente del anticuerpo (ADCC), la fagocitosis celular dependiente del anticuerpo (ADCP) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Dicha modificación se puede realizar introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones de aminoácidos no conservadoras) en o en la proximidad de una región Fc del anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión. Como alternativa, o además, se pueden introducir uno o varios restos de cisteína en o en la proximidad de la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro entre las cadenas en esta región. Como alternativa, o además, se pueden introducir uno o más sitios de glucosilación ligados a N en o en la proximidad de la región Fc, permitiendo de ese modo la glucosilación posterior a la traducción en dicha región, como se describe *supra*. El anticuerpo homodimérico o derivado del mismo, u otro agente de unión, así generado puede tener un deterioro de la capacidad de unión a receptores Fc γ . El anticuerpo homodimérico así generado también puede tener un deterioro de la capacidad de interiorización y/o una disminución de las respuestas de ADCC, ADCP y/o CDC.

40

La sustitución de aminoácidos afecta a la interacción de unión de la región Fc con el receptor Fc γ RIIIa. La sustitución del aminoácido nativo en un resto de cisteína se introduce en la posición de aminoácido 239.

En algunas realizaciones, para aumentar todavía más la semivida en suero del anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, se puede modificar cualquier epítipo de unión al receptor de rescate del anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, según lo descrito, por ejemplo, en la patente de EE.UU. Nº 5.739.277. Como se usa en el presente documento, la expresión "epítipo de unión al receptor de rescate" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable del aumento de la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG. Como alternativa, se puede aumentar la semivida en suero del anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, mediante la modificación de la región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, dominio constante de IgG) con respecto a la unión a los receptores Fc γ , como se describe más adelante.

Los anticuerpos pueden estar glucosilados en posiciones conservadas de sus regiones constantes (véase, por ejemplo, Jefferis y Lund, 1997, *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright y Morrison, 1997, *TibTECH* 15:26-32). Las cadenas laterales de oligosacárido de las inmunoglobulinas pueden afectar a la función de la proteína (véase, por ejemplo, Boyd *et al.*, 1996, *Mol. Immunol.* 32:1311-1318; Wittwe y Howard, 1990, *Biochem.* 29:4175-4180) y a la interacción intramolecular entre las porciones de la glucoproteína que puede afectar a la configuración y a la superficie tridimensional presentada de la glucoproteína (véase, por ejemplo, Jefferis y Lund, *supra*; Wyss y Wagner, 1996, *Current Opin. Biotech.* 7:409-416). Los oligosacáridos también pueden servir para dirigir una glucoproteína dada a ciertas moléculas basadas en estructuras de reconocimiento específicas. Por ejemplo, se ha informado que en la IgG agalactosilada, el resto de oligosacárido "se abate" fuera del espacio entre C_H2 y los restos de N-acetilglucosamina terminales quedan disponibles para unirse a la proteína de unión a la manosa (véase, por ejemplo, Malhotra *et al.*, 1995, *Nature Med.* 1: 237-243). La eliminación por glucopeptidasa de los oligosacáridos de CAMPATH-1H (un anticuerpo IgG1 monoclonal murino humanizado recombinante que reconoce el antígeno CDw52 de los linfocitos humanos) producido en células de ovario de hámster chino (CHO) produjo una reducción completa

65

de la lisis mediada por el complemento (CMCL) (Boyd *et al.*, 1996, *Mol Immunol.* 32: 1311-1318), mientras que la retirada selectiva de restos de ácido siálico usando neuraminidasa no produjo pérdida alguna de DMCL. También se ha informado que la glucosilación de los anticuerpos afecta a la ADCC. En particular, se informó que las células CHO con expresión regulada por la tetraciclina de $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una glucosiltransferasa que cataliza la formación de GlcNAc de bisección, tienen una mejor actividad de ADCC (véase, por ejemplo, Umana *et al.*, 1999, *Mature Biotech.* 17:176-180).

Por lo general, la glucosilación de los anticuerpos está ligada a N o a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato con la cadena lateral de un resto de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato con la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de dichas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

Los derivados de glucosilación de los anticuerpos son derivados en los que se altera el patrón de glucosilación de un anticuerpo. Por alteración se entiende la eliminación de uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo, la adición de uno o más restos de carbohidrato con el anticuerpo, el cambio de la composición de la glucosilación (es decir, el patrón de glucosilación), el grado de glucosilación, o similares.

La adición de sitios de glucosilación en el anticuerpo se realiza convenientemente modificando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas anteriormente (para los sitios de glucosilación unidos a N). La modificación también se puede realizar mediante la adición de, o sustitución con, uno o más restos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para los sitios de glucosilación unidos a O). Del mismo modo, la eliminación de sitios de glucosilación se puede realizar mediante la modificación de aminoácidos en los sitios de glucosilación nativos del anticuerpo.

La secuencia de aminoácidos normalmente se modifica mediante la alteración de la secuencia de ácido nucleico subyacente. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de los derivados de la secuencia de aminoácidos de origen natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida), mutagénesis por PCR o mutagénesis de casete de un derivado preparado previamente o una versión no derivada del anticuerpo.

La glucosilación (incluyendo el patrón de glucosilación) de los anticuerpos también se puede modificar sin alterar la secuencia de aminoácidos o la secuencia de nucleótidos subyacente. La glucosilación depende en gran medida de la célula huésped usada para expresar el anticuerpo. Dado que el tipo de célula usado para la expresión de glucoproteínas recombinantes, por ejemplo, anticuerpos, como posibles agentes terapéuticos raramente es la célula nativa, cabe esperar que se produzcan variaciones significativas del patrón de glucosilación de los anticuerpos. Véase, por ejemplo, Hse *et al.*, 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 9062-9070. Además de la elección de las células huésped, los factores que afectan a la glucosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen el modo de crecimiento, la formulación del medio, la densidad de cultivo, la oxigenación, el pH, los esquemas de purificación, y similares. Se han propuesto diversos métodos para modificar el patrón de glucosilación alcanzado en un determinado organismo huésped, incluyendo la introducción o la sobreexpresión de ciertas enzimas implicadas en la producción de oligosacáridos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.047.335; 5.510.261; y 5.278.299). La glucosilación, o ciertos tipos de glucosilación, se pueden eliminar enzimáticamente de la glucoproteína, por ejemplo, usando endoglucosidasa H (Endo H). Además, la célula huésped recombinante puede modificar por ingeniería genética, por ejemplo, hacerla defectuosa en el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas y otras técnicas son muy conocidas en la materia.

La estructura de glucosilación de los anticuerpos se puede analizar fácilmente mediante técnicas convencionales de análisis de carbohidratos, incluyendo cromatografía de lectina, RMN, espectrometría de masas, HPLC, GPC, análisis composicional de los monosacáridos, digestión enzimática secuencial y HPAEC-PAD, que usa cromatografía de intercambio aniónico a pH alto para separar los oligosacáridos en base a la carga. Los métodos para liberar oligosacáridos con fines analíticos también son conocidos, e incluyen, sin limitación, tratamiento enzimático (comúnmente realizado usando péptido-N-glucosidasa F/endo- β -galactosidasa), eliminación usando ambiente alcalino duro para liberar principalmente las estructuras ligadas a O y métodos químicos usando hidrazina anhidra para liberar los oligosacáridos tanto ligados a N como a O.

Los anticuerpos o derivados de los mismos, u otros agentes de unión, pueden tener modificaciones (por ejemplo, sustituciones, eliminaciones o adiciones) en restos de aminoácidos que interactúan con los receptores Fc γ . En particular, los anticuerpos o derivados de los mismos, u otros agentes de unión, incluyen anticuerpos o derivados de los mismos, u otros agentes de unión, que tienen modificaciones en los restos de aminoácido identificados como aquellos implicados en la interacción de unión entre el dominio Fc y uno o más receptores Fc γ (véase *más adelante*), así como anticuerpos o derivados de los mismos, u otros agentes de unión, que tienen modificaciones en los restos de aminoácido identificados como aquellos implicados en la interacción entre el dominio anti-Fc y el receptor FcRn.

(véase, por ejemplo, la publicación internacional N° WO 97/34631.

VI. Métodos para modificar la unión de agentes de unión a la diana con receptores Fc γ

- 5 En algunas realizaciones, la unión de un agente de unión a la diana con una o más receptores Fc γ puede verse afectada por el uso de una o más metodologías de modificación por ingeniería genética de anticuerpos conocidas en la técnica. En algunas realizaciones, la unión de un agente de unión a la diana con uno o más receptores Fc γ puede verse afectada por la reducción de las funciones efectoras del agente de unión a la diana usando una o más metodologías de modificación por ingeniería genética de anticuerpos conocidas en la técnica. A continuación, se proporcionan ejemplos ilustrativos, no limitantes, de dichas metodologías.

La unión de los receptores Fc γ es mediada a través de la interacción de una región de un anticuerpo con un receptor Fc γ (Fc γ R). La región o el dominio Fc se refiere a la/s región/es de una región constante de anticuerpo (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que está/n implicada/s en la interacción de unión de la región Fc con uno o más receptores Fc γ (por ejemplo, Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIb (CD32b) o Fc γ RIIIa (CD16)). Tanto el estado de glucosilación como la secuencia primaria de aminoácidos de la región Fc de IgG tienen efectos funcionales sobre la interacción de la región Fc-Fc γ R.

Se sabe que la sustitución de determinadas posiciones de aminoácido en la región Fc de las regiones constantes del isotipo de IgG tiene efectos funcionales sobre la capacidad de un anticuerpo para unirse a uno o más receptores Fc γ . Véase, por ejemplo, Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276: 6591- 6604 y Canfield y Morrison, 1991, *J. Exp. Med.* 173:1483-1491. La región Fc incluye, por ejemplo y sin limitación, los restos de aminoácidos de la región bisagra y el dominio C_H2. Cabe esperar que la sustitución de uno o más restos de aminoácidos en la región Fc o una parte de una región constante de IgG con aminoácidos no conservadores altere, es decir, reduzca la afinidad de la interacción de la región Fc-Fc γ R. Los métodos para introducir sustituciones de aminoácidos no conservadoras en un anticuerpo o agente del mismo, u otro agente de unión, son muy conocidos en la técnica.

Como alternativa o además, se pueden introducir uno o varios restos de cisteína en o en la proximidad de la región Fc o porción de una región constante de IgG, permitiendo así la formación de enlaces de disulfuro entre cadenas en dicha región. Cabe esperar que dicha formación de enlaces de disulfuro entre cadenas cause impedimento estérico, reduciendo así la afinidad de la interacción de unión de la región Fc-Fc γ R. El uno o varios restos de cisteína introducidos en o en la proximidad de la región Fc de una región constante de IgG también pueden servir como sitios para la conjugación a agentes terapéuticos (es decir, el acoplamiento de fármacos citotóxicos usando reactivos específicos de tiol, tales como derivados de maleimida de fármacos). Cabe esperar que la presencia de un agente terapéutico provoque impedimento estérico, reduciendo así la afinidad de la interacción de la región Fc-Fc γ R. Los métodos para introducir restos de cisteína en un anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, son muy conocidos en la técnica.

Como alternativa o además, se pueden introducir uno o más sitios de glucosilación unidos a N en o en la proximidad de la región Fc de una región constante de IgG, permitiendo de ese modo la glucosilación posterior a la traducción en dicha región. Cabe esperar que dicha glucosilación ligada a N cause impedimento estérico, reduciendo así la afinidad de la interacción de la región Fc-Fc γ R. Los métodos para introducir sitios de glucosilación ligados a N en un anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, son muy conocidos en la técnica.

Una sustitución sistémica de aminoácidos expuestos a disolventes de la región Fc de IgG1 humana ha generado derivados de IgG con afinidades de unión a Fc γ R modificadas (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-604). Por ejemplo, cuando se compara con la IgG1 parental un subconjunto de dichos derivados que incluyen sustituciones en Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334 o Ser298/Glu333/Lys334 con respecto a Ala demuestran aumentos tanto en la afinidad de unión hacia Fc γ R como en la actividad de ADCC (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-604; Okazaki *et al.*, 2004, *J. Mol. Biol.* 336: 1239-49). Por el contrario, cuando se compara con la IgG1 parental un subconjunto de dichos derivados que incluyen sustituciones en Glu233 con respecto a Pro/Leu234 con respecto a Val/Leu235 con respecto a Ala y la eliminación de Gly 236, Pro238 con respecto a Ala, Asp265 con respecto a Ala, Asn297 con respecto a Ala, Ala 327 con respecto a Gln o Pro329 con respecto a Ala demuestran reducciones en las afinidades de unión con todos los Fc γ R; la sustitución de Asp265 con respecto a Ala también generó la reducción de la actividad de ADCC (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-604). Se ha observado que los aminoácidos de la región bisagra y el dominio C_H2 contribuyen a la alta afinidad de la IgG humana por Fc γ R (Canfield y Morrison, 1991, *J. Exp. Med.* 173: 1483-1491). Dichas posiciones de aminoácidos o los aminoácidos en la proximidad de las mismas que participan en la mediación de la interacción de unión de la región Fc-Fc γ R son posibles dianas para el reemplazo por aminoácidos no conservadores y/o la introducción de una o más cisteínas y/o la introducción de uno o más sitios de glucosilación ligados a N.

La semivida *in vivo* de un anticuerpo también puede influir en sus funciones efectoras. En algunas realizaciones, es deseable aumentar la semivida de un anticuerpo para modificar sus actividades terapéuticas. En algunas realizaciones, es deseable reducir la semivida de un anticuerpo para modificar sus actividades terapéuticas. FcRn es un receptor que es estructuralmente similar al antígeno de clase MHC I que se asocia de manera no covalente con

la $\beta 2$ -microglobulina. FcRn regula el catabolismo de las IgG y su transcitosis a través de los tejidos (Ghetie y Ward, 2000, *Annu. Rev. Immunol.* 18: 739-766; Ghetie y Ward, 2002, *Immunol Res.* 25:97-113). La interacción de IgG-FcRn tiene lugar a pH 6,0 (pH de las vesículas intracelulares), pero no a pH 7,4 (pH de la sangre); y dicha interacción permite a las IgG reciclarse de nuevo a la circulación (Ghetie y Ward, 2000, *Ann. Rev. Immunol.* 18: 739-766; Ghetie y Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25: 97-113). Se ha mapeado la región de la IgG₁ humana implicada en la unión de FcRn (Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-604). Las sustituciones de alanina en las posiciones Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382 o Asn434 de la IgG₁ humana aumenta la unión de FcRn (Shields *et al.*, 2001, *J Biol. Chem.* 276: 6591-604). Se espera que las moléculas de IgG₁ que albergan dichas sustituciones tengan semividas en suero más largas. Por consiguiente, dichas moléculas de IgG₁ modificadas pueden ser capaces de llevar a cabo sus funciones efectoras y, por lo tanto, de ejercer sus eficacias terapéuticas, durante un período de tiempo más largo en comparación con la IgG₁ no modificada.

En una realización, los agentes de unión a la diana variantes, que tienen afectada la unión a uno o más Fc γ R, conservan, al menos en cierta medida, la capacidad de unirse a FcRn. En una realización ilustrativa, los agentes de unión a la diana variantes, que tienen afectada la unión a uno o más Fc γ R, conservan la capacidad de unirse a FcRn. La capacidad de un anticuerpo o derivado del mismo, u otro agente de unión, para unirse a FcRn se puede medir por técnicas conocidas en la materia (por ejemplo, Shields *et al.*, 2001, *J Biol. Chem.* 276: 6591-604). El agente de unión a la diana variante se une a FcRn con al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de la afinidad de un agente de unión a la diana no variante para unirse a FcRn.

VII. Modelos animales de trastornos inmunológicos o cánceres

Los agentes de unión anti-diana, por ejemplo, anticuerpos o derivados, se pueden ensayar o validar en modelos animales de trastornos inmunológicos o cánceres. Hay una serie de modelos animales establecidos de trastornos inmunológicos o cánceres que son conocidos por el experto en la materia, pudiéndose usar cualquiera de ellos para ensayar la eficacia de un agente de unión a la diana. Los ejemplos no limitantes de dichos modelos se describen más adelante.

Hay ejemplos de modelos animales de enfermedades autoinmunes sistémicas y específicas de un órgano, incluyendo diabetes, lupus, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, encefalomiелitis autoinmune experimental (esclerosis múltiple), tiroiditis, miastenia gravis, artritis, uveítis y enfermedad inflamatoria intestinal descritos por Bigazzi, "Animal Models of Autoimmunity: Spontaneous and Induced", en *The Autoimmune Diseases* (Rose and Mackay eds., Academic Press, 1998) y en "Animal Models for Autoimmune and Inflammatory Disease" en *Current Protocols in Immunology* (Coligan *et al.* eds., Wiley and Sons, 1997).

Las afecciones alérgicas, por ejemplo, el asma y la dermatitis, también se pueden modelizar en roedores. Es posible inducir la hipersensibilidad de las vías respiratorias en ratones mediante ovoalbúmina (Tomkinson *et al.*, 2001, *J. Immunol* 166:5792-800) o antígenos de los huevos de *Schistosoma mansoni* (Tesciuba *et al.*, 2001, *J. Immunol.* 167: 1996-2003). La cepa Nc/Nga de ratones muestra un aumento notable de la IgE en suero y el desarrollo espontáneo de lesiones de tipo dermatitis atópica (Vestergaard *et al.*, 2000, *Mol. Med. Today* 6: 209-10; Watanabe *et al.*, 1997, *Int. Immunol.* 9:461-66; Saskawa *et al.*, 2001, *Int. Arch. Allergy Immunol* 126: 239-47).

La inyección de linfocitos de donante inmunocompetentes en un huésped histo-incompatible letalmente irradiado es una metodología clásica para inducir GVHD en ratones. Como alternativa, el modelo murino B6D2F1 precursor proporciona un sistema para inducir GVHD tanto aguda como crónica. En dicho modelo, los ratones B6D2F1 son la progenie F1 de un cruce entre las cepas parentales de los ratones C57BL/6 y DBA/2. La transferencia de células linfoides DBA/2 en ratones B6D2F1 no irradiados provoca GVHD crónica, mientras que la transferencia de células linfoides C57BL/6, C57BL/10 o B10.D2 provoca GVHD aguda (Slayback *et al.*, 2000, *Bone Marrow Transpl.* 26: 931-938; Kataoka *et al.*, 2001, *Immunology* 103: 310-318).

Además, se pueden inyectar tanto células madre hematopoyéticas humanas como células linfoides maduras de sangre periférica en ratones SCID, y que dichas células linfo-hematopoyéticas humanas sigan siendo funcionales en los ratones SCID (McCune *et al.*, 1988, *Science* 241:1632-1639; Kamel-Reid y Dick, 1988, *Science* 242:1706-1709; Mosier *et al.*, 1988, *Nature* 335:256-259). Esto ha proporcionado un pequeño sistema de modelo animal para el ensayo directo de posibles agentes terapéuticos en células linfoides humanas. (Véase, por ejemplo, Tournoy *et al.*, 2001, *J. Immunol.* 166:6982-6991).

Por otra parte, los modelos animales pequeños para examinar las eficacias *in vivo* de los agentes de unión a la diana se pueden crear mediante la implantación de líneas celulares tumorales humanas que expresen el antígeno diana en cepas apropiadas de roedores inmunodeficientes, por ejemplo, ratones desnudos atímicos o ratones SCID. Los ejemplos de líneas celulares de linfoma humanas que expresen el antígeno diana incluyen, por ejemplo, Daudi (Ghetie *et al.*, 1994, "Blood" 83:1329-36; Ghetie *et al.*, 1990, *Int. J. Cancer* 15:481-85; de Mont *et al.*, 2001, *Cancer Res.* 61:7654-59), HS-Sultan (Cattan y Maung, 1996, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 38:548-52; Cattan y Douglas, 1994, *Leuk. Res.* 18:513-22), Raji (Ochakovskaya *et al.*, 2001, *Clin. Cancer Res.* 7:1505-10; Breisto *et al.*, 1999, *Cancer Res.* 59:2944-49), y CA46 (Kreitman *et al.*, 1999, *Int. J. Cancer* 81:148-55). Un ejemplo no limitante de línea

de linfoma de Hodgkin es L428 (Drexler, 1993, *Leuk. Lymphoma* 9:1-25; Dewan *et al.*, 2005, *Cancer Sci.* 96:466-473). Los ejemplos no limitantes de líneas celulares de carcinoma de células renales humanas incluyen 786-O (Ananth *et al.*, 1999, *Cancer Res.* 59:2210-16; 25 Datta *et al.*, 2001, *Cancer Res.* 61:1768-75), ACHN (Hara *et al.*, 2001, *J. Urol.* 166:2491-94; Miyake *et al.*, 2002, *J. Urol.* 167:2203-08), Caki-1 (Prewett *et al.*, 1998, *Clin. Cancer Res.* 4:2957-66; Shi y Siemann, 2002, *Br. J. Cancer* 87:119-26) y Caki-2 (Zellweger *et al.*, 2001, *Neoplasia* 3:360-67). Los ejemplos no limitantes de líneas celulares de carcinoma nasofaríngeo incluyen C15 y C17 (Busson *et al.*, 1988, *Int. J. Cancer* 42:599-606; Bernheim *et al.*, 1993, *Cancer Genet. Cytogenet.* 66:11-5). Los ejemplos no limitantes de líneas celulares de glioma humano incluyen U373 (Palma *et al.*, 2000, *Br. J. Cancer* 30 82:480-7) y U87MG (Johns *et al.*, 2002, *Int. J. Cancer* 98:398-408). Los ejemplos no limitantes de líneas celulares de mieloma múltiple incluyen MM.1S (Greenstein *et al.*, 2003, "Experimental Hematology" 31:271-282) y L363 (Diehl *et al.*, 1978, *Blut* 36:331-338). (Véase también Drexler y Matsuo, 2000, *Leukemia Research* 24:681-703). Dichas líneas de células tumorales se pueden establecer en anfitriones roedores inmunodeficientes, bien como tumor sólido mediante inyecciones subcutáneas o como tumores diseminados mediante inyecciones intravenosas. Una vez establecidos dentro de un huésped, estos modelos de xenoinjerto tumoral se pueden aplicar en la evaluación de las eficacias terapéuticas del agente de unión a la diana como se describe en el presente documento en la modulación del crecimiento tumoral *in vivo*.

VIII. Trastornos

Los agentes de unión a la diana (por ejemplo, anticuerpos y derivados o anticuerpos y derivados conjugados con agentes terapéuticos) como se han descrito en el presente documento son útiles para el tratamiento o la prevención de un cáncer que exprese un antígeno diana o un trastorno inmunológico caracterizado por la expresión del antígeno diana mediante la activación inapropiada de células inmunes (por ejemplo, linfocitos o células dendríticas). Dicha expresión de un antígeno diana se puede deber, por ejemplo, al aumento de los niveles de proteína diana en la superficie celular y/o a la alteración de la antigenicidad del antígeno expresado. El tratamiento o la prevención del trastorno inmunológico, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, se consigue mediante la administración a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento o dicha prevención de una cantidad eficaz del agente de unión a la diana, mediante lo que el agente (i) se une a las células inmunes (por ejemplo, las células inmunes activadas) que expresan el antígeno diana y que están asociadas con el estado patológico y (ii) ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador sobre las células inmunes.

Las enfermedades inmunológicas que se caracterizan por la activación inapropiada de las células inmunes y que se pueden tratar o prevenir mediante los métodos descritos en el presente documento se pueden clasificar, por ejemplo, según el/los tipo/s de la reacción de hipersensibilidad que subyacen al trastorno. Dichas reacciones se suelen clasificar en cuatro tipos: reacciones anafilácticas, reacciones citotóxicas (citolíticas), reacciones de complejos inmunes o reacciones de inmunidad mediadas por células (CMI) (también conocidas como reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH)). (Véase, por ejemplo, *Fundamental Immunology* (William E. Paul ed., Raven Press, Nueva York, III ed. 1993)).

Los ejemplos específicos de dichas enfermedades inmunológicas incluyen las siguientes: artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedades desmielinizantes autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple, encefalomiелitis alérgica), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, lupus eritematoso sistémico, miastenia gravis, enfermedad de Grave, glomerulonefritis, trastorno hepatológico autoinmune, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn), anafilaxis, reacción alérgica, síndrome de Sjogren, diabetes mellitus de tipo I, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, fibromialgia, polimiositis, dermatomiositis, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, uveítis autoinmune, enfermedad de Addison, adrenalitis, tiroiditis, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad tiroidea autoinmune, anemia perniciosa, atrofia gástrica, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, aterosclerosis, lupus eritematoso cutáneo subagudo, hipoparatiroidismo, síndrome de Dressler, trombocitopenia autoinmune, púrpura trombocitopénica idiopática, anemia hemolítica, pénfigo vulgar, pénfigo, dermatitis herpetiforme, alopecia areata, pénfigo, esclerodermia, esclerosis sistémica progresiva, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmune masculina y femenina, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa, enfermedad del tejido conjuntivo mixto, poliarteritis nodosa, vasculitis necrotizante sistémica, dermatitis atópica, rinitis atópica, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Chagas, sarcoidosis, fiebre reumática, asma, aborto recurrente, síndrome antifosfolipídico, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome posterior a cardiomiелitis, síndrome de Cushing, hepatitis activa crónica autoinmune, pulmón del cuidador de aves, necrólisis epidérmica tóxica, síndrome de Alport, alveolitis, alveolitis alérgica, alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, eritema nudoso, pioderma gangrenosa, reacción a la transfusión, arteritis de Takayasu, polimialgia reumática, arteritis temporal, esquistosomiasis, arteritis de células gigantes, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, eczema, granulomatosis linfomatoide, enfermedad de Behcet, síndrome de Caplan, enfermedad de Kawasaki, dengue, encefalomiелitis, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, endoftalmitis, eritema elevado y persistente, soriasis, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shuhnan, síndrome de Felty, filariasis, ciclitis, ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, ciclitis de Fuch, nefropatía de IgA, púrpura de Henoch-Schonlein, enfermedad del injerto contra el huésped, rechazo de trasplantes, cardiomiopatía, síndrome de Eaton-Lambert, policondritis recidivante, crioglobulinemia, macroglobulinemia de Waldenstrom, síndrome de Evans e insuficiencia gonadal autoinmune.

Por consiguiente, los métodos descritos en el presente documento engloban el tratamiento de trastornos de linfocitos B (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Goodpasture, artritis reumatoide la diabetes de tipo I), Th₁-linfocitos (por ejemplo, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, soriasis, síndrome de Sjorgren, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Grave, cirrosis biliar primaria, granulomatosis de Wegener, tuberculosis o enfermedad del injerto contra el huésped), o Th₂-linfocitos (por ejemplo, dermatitis atópica, lupus eritematoso sistémico, asma atópico, rinoconjuntivitis, rinitis alérgica, síndrome de Omenn, esclerosis sistémica o enfermedad del injerto contra el huésped crónica). En general, los trastornos relacionados con las células dendríticas implican trastornos de Th₁-linfocitos y Th₂-linfocitos.

En algunas realizaciones, el trastorno inmunológico es un trastorno inmunológico mediado por linfocitos T, tal como un trastorno de linfocitos T, en el que los linfocitos T activados asociados con el trastorno expresan el antígeno diana. Los agentes de unión anti-diana (por ejemplo, anticuerpos o derivados) se pueden administrar para agotar dichos linfocitos T. En una realización específica, la administración de anticuerpos o derivados puede agotar los linfocitos T activados que expresan CD70, mientras que los linfocitos T en reposo no son sustancialmente agotados por el anti-CD70 o derivado. En dicho contexto, "no son sustancialmente agotados" significa que se agota menos de aproximadamente el 60 %, o menos de aproximadamente el 70 % o menos de aproximadamente 80 % de los linfocitos T en reposo.

Los agentes de unión a la diana (por ejemplo, anticuerpos y derivados o anticuerpos y derivados conjugados con agentes terapéuticos) también son útiles para el tratamiento o la prevención de un cáncer que expresa el antígeno diana. El tratamiento o la prevención de un cáncer, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento, se consigue mediante la administración a un sujeto en necesidad de dicho tratamiento o dicha prevención de una cantidad eficaz del agente de unión a la diana, mediante lo que el anticuerpo o derivado (i) se une a las células cancerosas que expresan el antígeno diana y (ii) ejerce un efecto citotóxico o citostático para agotar o inhibir la proliferación de las células cancerosas que expresan el antígeno diana. El efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador es ejercido por la conjugación a un agente citotóxico, citostático o inmunomodulador.

Los cánceres que se pueden tratar mediante el uso de un agente de unión a la diana incluyen tumores malignos y trastornos relacionados, tales como los siguientes: una leucemia, tal como una leucemia aguda, tal como leucemia linfocítica aguda o leucemia mielocítica aguda (mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica o eritroleucemia) o una leucemia crónica tal como leucemia mielocítica crónica (granulocítica) o leucemia linfocítica crónica; policitemia vera; un linfoma tal como la enfermedad de Hodgkin o enfermedad no Hodgkin (linfoma); mieloma múltiple; macroglobulinemia de Waldenstrom; enfermedad de cadena pesada; o un tumor sólido tal como sarcomas y carcinomas (por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, carcinoma colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, cáncer de útero, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de pulmón no microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma nasofaríngeo o carcinoma de esófago.

Los cánceres que expresan CD70 que se pueden tratar o prevenir mediante los métodos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, diferentes subtipos de linfoma no Hodgkin (LNH indolentes, LNH foliculares, pequeños linfomas linfocíticos, LNH linfoplasmocitarios o LNH de zona marginal); enfermedad de Hodgkin (por ejemplo, células de Reed-Sternberg); cánceres del linaje de células B, incluyendo, por ejemplo, linfomas de células B grandes difusas, linfomas foliculares, linfoma de Burkitt, linfoma de células del manto, leucemias linfocíticas de células B (por ejemplo, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica); linfomas de células B positivas en el virus de Epstein Barr; carcinomas de células renales (por ejemplo, células claras y papilares); carcinomas nasofaríngeos; carcinomas tímicos; gliomas; glioblastomas; neuroblastomas; astrocitomas; meningiomas; macroglobulinemia de Waldenstrom; mielomas múltiples; y carcinoma de colon, estómago y rectal. El cáncer puede ser, por ejemplo, recién diagnosticado, tratado previamente o refractario o en recaída. En algunas realizaciones, un cáncer que expresa CD70 tiene al menos aproximadamente 15.000, al menos aproximadamente 10.000 o al menos aproximadamente 5.000 moléculas de CD70/célula.

IX. Composiciones farmacéuticas que comprenden conjugados de agentes de unión a la diana variantes y administración de los mismos

Una composición que comprende un agente de unión a la diana (por ejemplo, un anticuerpo o derivado, solo o conjugado a un agente terapéutico) se puede administrar a un sujeto que tenga o que esté en riesgo de tener un trastorno inmunológico o un cáncer. La invención proporciona además el uso de un agente de unión a la diana (por ejemplo, un anticuerpo o derivado, solo o conjugado a un agente terapéutico) en la fabricación de un fármaco para la

prevención o el tratamiento de cáncer o trastorno inmunológico. El término "sujeto" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier paciente mamífero al que se pueda administrar un agente de unión a la diana, incluyendo, por ejemplo, seres humanos y mamíferos no humanos tales como primates, roedores y perros. Los sujetos destinados específicamente al tratamiento usando los métodos descritos en el presente documento incluyen seres humanos. Los agentes de unión a la diana se pueden administrar bien solos o en combinación con otras composiciones en la prevención o el tratamiento del trastorno inmunológico o un cáncer.

Se conocen varios sistemas de administración, y se pueden usar para administrar el agente de unión a la diana. Los métodos de introducción incluyen, pero sin limitación, la vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. El agente de unión a la diana se puede administrar, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo (por ejemplo, intravenosa o subcutánea), mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal e intestinal, y similares) y se puede administrar junto con otros agentes biológicamente activos tales como agentes quimioterapéuticos. La administración puede ser sistémica o local.

En realizaciones específicas, la composición de agente de unión a la diana se administra por inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio o por medio de un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo una membrana, tal como una membrana sialástica o una fibra. Por lo general, cuando se administra la composición, se usan materiales no absorbidos por el agente de unión anti-diana.

En otras realizaciones, el agente de unión anti-diana se administra en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Sefton, 1989, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase "Medical Applications of Controlled Release" (Langer and Wise eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1974); "Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance" (Smolen and Ball eds., Wiley, Nueva York, 1984); Ranger y Peppas, 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61. Véase también Levy *et al.*, 1985, *Science* 228:190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). Otros sistemas de liberación controlada se describen, por ejemplo, en Langer, *supra*.

Un agente de unión a la diana (por ejemplo, un anticuerpo o derivado, solo o conjugado a un agente terapéutico) se pueden administrar como composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de unión y uno o más ingredientes farmacéuticamente compatibles. Por ejemplo, la composición farmacéutica normalmente incluye uno o más vehículos farmacéuticos (por ejemplo, líquidos estériles tales como agua y aceites, incluyendo petróleo, aceites de origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares). El agua es un vehículo más común cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden emplear como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes del pH. Dichas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares. La composición se puede formular en forma de un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. Las formulaciones orales pueden incluir vehículos convencionales tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína, normalmente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración apropiada al paciente. Las formulaciones se corresponden con el modo de administración.

En realizaciones típicas, la composición farmacéutica se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada a la administración intravenosa a seres humanos. Por lo general, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición farmacéutica también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran bien por separado o mezclados en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o un concentrado exento de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o un sobre que indique la cantidad de principio activo. Cuando la composición farmacéutica se va a administrar por infusión, se puede dispensar con un frasco de infusión que contenga agua de calidad farmacéutica estéril o solución salina. Cuando la composición farmacéutica se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de manera que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Además, la composición farmacéutica se puede proporcionar como un kit farmacéutico que comprende (a) un recipiente que contiene un agente de unión a la diana (por ejemplo, un anticuerpo o derivado, solo o conjugado a un

agente terapéutico) en forma liofilizada; y (b) un segundo recipiente que contiene un diluyente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, agua estéril) para inyección. El diluyente farmacéuticamente aceptable se puede usar para la reconstitución o dilución del agente de unión a la diana liofilizado. Opcionalmente, asociada con dicho/s recipiente/s, puede haber una nota en la forma prescrita por un organismo gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación por parte del organismo de fabricación, uso o venta para la administración a seres humanos.

La cantidad del agente de unión a la diana (por ejemplo, un anticuerpo o derivado, solo o conjugado a un agente terapéutico) que es eficaz en el tratamiento o la prevención de un trastorno inmunológico o un cáncer se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales. Además, opcionalmente, se pueden emplear ensayos *in vitro* para ayudar en la identificación de los intervalos de dosificación óptimos. La dosis exacta que se empleará en la formulación dependerá también de la vía de administración, y de la fase del trastorno inmunológico o del cáncer, y debe decidirse según el juicio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o realizados en modelos con animales.

Por ejemplo, es posible determinar la toxicidad y la eficacia terapéutica del anticuerpo o derivado en cultivos celulares o en animales experimentales mediante procedimientos farmacéuticos convencionales para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación DL_{50}/DE_{50} . Se prefiere un agente de unión a la diana (por ejemplo, un anticuerpo o derivado) que presente un alto índice terapéutico. Cuando un agente de unión a la diana presenta efectos secundarios tóxicos, se puede usar un sistema de administración que dirija el agente de unión a la diana a la zona del tejido afectado para reducir al mínimo el posible daño a las células que expresan el antígeno no diana y, de ese modo, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y en los estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosis del agente de unión a la diana normalmente se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de dicho intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para un agente de unión a la diana usado en el método, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones en circulación en plasma que incluya la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición media máxima de los síntomas) según se determina en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar con mayor exactitud las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

En general, la dosis del agente de unión al antígeno administrada a un paciente con un trastorno inmunológico o cáncer es de aproximadamente 0,1 mg/kg a 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. Más normalmente, la dosis administrada a un sujeto es de 0,1 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal del sujeto, incluso más normalmente de 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,5 mg/kg o 1 mg/kg a 20 mg/kg, 15 mg/kg, 12 mg/kg, 10 mg/kg, 7,5 mg/kg, 5 mg/kg o 3 mg/kg de peso corporal del sujeto. En general, los anticuerpos humanos tienen una semivida más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de otras especies debido a la respuesta inmune a las proteínas foráneas. Por lo tanto, a menudo, es posible administrar dosis inferiores de agente de unión a la diana que comprende anticuerpos humanizados o quiméricos y con menor frecuencia.

Una dosis de un agente de unión a la diana se puede administrar, por ejemplo, diariamente, una vez a la semana (semanalmente), dos veces a la semana, tres veces a la semana, cuatro veces a la semana, cinco veces a la semana, quincenalmente, mensualmente o de otra manera según lo necesario.

En algunas realizaciones, la dosis de un agente de unión anti-diana corresponde a una dosis subóptima (es decir, por debajo de la CE_{50} para el agente de unión anti-diana [por ejemplo, un conjugado de anticuerpo y fármaco]). Por ejemplo, la dosis de un agente de unión anti-diana puede comprender una dosis seleccionada entre el 25 % más bajo, el 15 % más bajo, el 10 % más bajo o el 5 % más bajo de la franja terapéutica. Como se usa en el presente documento, la expresión "franja terapéutica" se refiere al intervalo de dosis de un fármaco o de su concentración en un sistema corporal que proporciona una terapia segura y eficaz.

En algunas realizaciones, la dosis de un agente de unión a la diana es de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, o de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,9 mg/kg, o de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,75 mg/kg de peso corporal del sujeto. Dicha dosis se puede administrar de 1 a aproximadamente 15 veces a la semana. Cada dosis puede ser igual o diferente. Por ejemplo, se puede administrar una dosis de aproximadamente 0,15 mg/kg de un agente de unión anti-diana de 1 a 10 veces por período de cuatro días, cinco días, seis días o siete días.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden el agente de unión a la diana pueden comprender además un agente terapéutico (por ejemplo, un agente citotóxico o inmunomodulador no conjugado tal como, por ejemplo, cualquiera de los descritos en el presente documento). El agente de unión anti-diana también se puede administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento o la prevención de trastornos inmunológicos o cánceres. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un agente terapéutico (por ejemplo, un agente citostático, citotóxico o inmunomodulador, tal como un agente citostático, citotóxico o inmunomodulador no conjugado tal como los usados convencionalmente para el tratamiento de cánceres o trastornos inmunológicos). La terapia de combinación también puede incluir, por ejemplo, la administración de un agente dirigido a un receptor o complejo de receptores distinto del antígeno diana en la superficie de los linfocitos activados, células dendríticas o células cancerosas. Un ejemplo de dicho agente incluye un segundo anticuerpo que se une a una molécula en la superficie de un linfocito activado, célula dendrítica o célula cancerosa. Otro ejemplo incluye un ligando que se dirige a dicho receptor o complejo de receptores. Por lo general, dicho anticuerpo o ligando se une a un receptor de superficie celular en linfocitos activados, célula dendrítica o célula cancerosa, y aumenta el efecto citotóxico o citostático del agente de unión a la diana mediante la administración de una señal citostática o citotóxica al linfocito activado, la célula dendrítica o la célula cancerosa. Dicha administración combinatoria puede tener un efecto aditivo o sinérgico sobre los parámetros de la enfermedad (por ejemplo, la gravedad de un síntoma, el número de síntomas o la frecuencia de las recaídas).

Con respecto a los regímenes terapéuticos para la administración combinatoria, en una realización específica, se administra un agente de unión anti-diana simultáneamente con un agente terapéutico. En otra realización específica, el agente terapéutico se administra antes o después de la administración del agente de unión a la diana, en al menos una hora y hasta varios meses, por ejemplo, al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes o tres meses, antes o después de la administración del agente de unión a la diana. En algunas realizaciones, el sujeto es monitorizado tras la administración del agente de unión anti-diana y, opcionalmente, del agente terapéutico.

El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, cualquier agente que ejerza un efecto terapéutico sobre las células cancerosas o células inmunes activadas. Por lo general, el agente terapéutico es un agente citotóxico o inmunomodulador. Dicha administración combinatoria puede tener un efecto aditivo o sinérgico sobre los parámetros de la enfermedad (por ejemplo, la gravedad de un síntoma, el número de síntomas o la frecuencia de las recaídas).

Las clases útiles de agentes citotóxicos o inmunomoduladores incluyen, por ejemplo, agentes antitubulina, auristatinas, agentes de unión al surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino tales como cisplatino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de la quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, lexitropsinas, nitrosoureas, platinos, compuestos de preformación, antimetabolitos de purina, puomicinas, sensibilizadores de la radiación, esteroides, taxanos, inhibidores de la topoisomerasa, alcaloides de la vinca y similares.

Los agentes citotóxicos e inmunomoduladores individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramycin (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, butionina sulfoximina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citidina, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (actinomicina), daunorubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluordesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gramicidina D, hidroxiaurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbina, rapamicina (sirolimus), estreptozotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tiotepa, topotecán, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

En algunas realizaciones típicas, el agente terapéutico es un agente citotóxico. Los agentes citotóxicos adecuados incluyen, por ejemplo, dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE), agentes de unión al surco menor del ADN (por ejemplo, enedinas y lexitropsinas), duocarmicinas, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), puomicinas, alcaloides de la vinca, CC-1065, SN-38, topotecán, morfolino-doxombicina, rizoxina, cianomorfolino-doxorubicina, equinomicina, combretastatina, netropsina, epotilona A y B, estramustina, criptofisinas, cernadotina, maitansinoides, discodermolida, eleuterobina y mitoxantrona.

En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico convencional tal como, por ejemplo, doxorubicina, paclitaxel, melfalán, alcaloides de la vinca, metotrexato, mitomicina C o etopósido. En algunas realizaciones, el agente terapéutico puede ser una terapia combinada tal como CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, prednisolona y vincristina), CHOP-R (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisolona y rituximab), ICE (idarubicina, alta dosis de arabinósido de citosina y etopósido) o ABVD (doxorubicina, bleomicina, vinblastina y Dacarbazina). Los agentes tales como los análogos de CC-1065, caliqueamicina, maitansina, análogos de dolastatina 10, rizoxina y palitoxina se pueden unir al agente de unión a la diana variante.

En realizaciones específicas, el agente citotóxico o citostático es auristatina E o un derivado de la misma. Por lo general, el derivado de auristatina E es, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar la auristatina E con ácido paraacetil-benzoico o ácido benzoilvalérico para

producir AEB y AEVB, respectivamente. Otros derivados típicos de la auristatina incluyen AFP, MMAF y MMAE. La síntesis y estructura de la auristatina E y sus derivados se describen en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N° 20030083263 y 20050009751), y en las patentes de EE.UU. N° 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414.

En realizaciones específicas, el agente citotóxico es un agente de unión al surco menor del ADN. (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.130.237). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el agente de unión al surco menor es un compuesto CBI. En otras realizaciones, el agente de unión al surco menor es una enediína (por ejemplo, caliqueamicina).

Los ejemplos de agentes antitubulina incluyen, pero sin limitación, taxanos (por ejemplo, Taxol® (paclitaxel), Taxotere® (docetaxel)), T67 (Tularik), alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina) y dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB). Otros agentes antitubulina incluyen, por ejemplo, derivados de baccatina, análogos de taxano (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colchimid, estramustina, criptofisininas, cemadotina, maitansinoides, combretastatinas, discodermolida y eleuterobina.

En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un maitansinoide, otro grupo de agentes antitubulina. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el maitansinoide es maitansina o DM-1 (ImmunoGen, Inc.; véase también Chari *et al.*, 1992, *Cancer Res.* 52: 127-131).

En algunas realizaciones, el agente terapéutico no es un radioisótopo. En algunas realizaciones, el agente terapéutico no es ricina ni saporina.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico es un agente anti-VEGF tal como AVASTIN (bevacizumab) o NEXAVAR (Sorafenib); un bloqueador de PDGF tal como SUTENT (malato de sunitinib); o un inhibidor de quinasa tal como NEXAVAR (tosilato de sorafenib).

En algunas realizaciones, el agente citotóxico o inmunomodulador es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser, por ejemplo, un antagonista de purina (por ejemplo, azotioquina o micofenolato de mofetilo), un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (por ejemplo, metotrexato), aciclovir, ganciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavirina, azidotimidina, arabinósido de citidina, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, poscarnet o trifluridina.

En otras realizaciones, el agente citotóxico o inmunomodulador es tacrolimus, ciclosporina o rapamicina. En realizaciones adicionales, el agente citotóxico es aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, alitretamina, amifostina, anastrozol, trióxido de arsénico, bexaroteno, bexaroteno, calusterona, capecitabina, celecoxib, cladribina, darbepoetina α , denileucina diftotox, dexrazoxano, propionato de dromostanolona, epirubicina, epoetina α , estramustina, exemestano, Filgrastim, floxuridina, fludarabina, fulvestrant, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, goserelina, idarubicina, ifosfamida, imatinib mesilato, interferón α -2a, irinotecán, letrozol, leucovorina, levamisol, mecloretamina o mostaza de nitrógeno, megestrol, mesna, metotrexato, metoxsalen, mitomicina C, mitotano fenpropionato nandrolona, oprelvekin, oxaliplatino, pamidronato, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, pentostatina, pipobromán, plicamicina, porfímero sódico, procarbazona, quinacrina, rasburicase, sargramostim, estreptozocina, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testolactona, tioguanina, toremifeno, Tositumomab, Trastuzumab, tretinoína, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina o zoledronato.

En realizaciones adicionales, el agente terapéutico es un anticuerpo tal como un anticuerpo monoclonal anti-HER2 humanizado, RITUXAN (rituximab; Genentech; un anticuerpo monoclonal anti-CD20 quimérico); OVAREX (AltaRex Corporation, MA); PANOREX (Glaxo Wellcome, NC; un anticuerpo IgG2a murino); Cetuximab Erbitux (Imclone Systems Inc., NY; un anticuerpo quimérico IgG anti-EGFR); Vitaxin (MedImmune, Inc., MD; Campath I/H (Leukosite, MA; un anticuerpo IgG1 humanizado); Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA; un anticuerpo IgG anti-CD33 humanizado); LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ; un anticuerpo IgG anti-CD22 humanizado); Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA; un anticuerpo anti-HLA-DR humanizado); Oncolym (Techniclone, Inc., CA; un anticuerpo anti-HLA-Dr10 murino radiomarcado); Allomune (BioTransplant, CA; un mAb anti-CD2 humanizado); Avastin (Genentech, Inc., CA; un anticuerpo humanizado anti-VEGF); Epratuzumab (Immunomedics, Inc., NJ y Amgen, CA; un anticuerpo anti-CD22); y CEAcide (Immunomedics, NJ; un anticuerpo anti-CEA humanizado); o un anticuerpo anti-CD40 (por ejemplo, según lo desvelado en la patente de EE.UU. N° 6.838.261).

Otros anticuerpos adecuados incluyen, pero sin limitación, los anticuerpos contra los siguientes antígenos: CA125, CA15-3, CA19-9, L6, Lewis Y, Lewis X, α fetoproteína, CA 242, fosfatasa alcalina placentaria, antígeno específico de la próstata, fosfatasa ácida prostática, factor de crecimiento epidérmico, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-4, receptor anti-transferrina, p97, MUC1-KLH, CEA, gp100, MART1, antígeno específico de la próstata, receptor IL-2, CD20, CD52, CD33, CD22, gonadotropina coriónica humana, CD38, CD40, mucina, P21, MPG y producto oncogénico Neu.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente inmunomodulador. El agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, ganciclovir, etanercept, tacrolimus, ciclosporina, rapamicina, REVLIMID (lenalidomida), ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato de mofetilo o metotrexato. Como alternativa, el agente inmunomodulador puede ser, por ejemplo, un glucocorticoide (por ejemplo, cortisol o aldosterona) o un análogo de glucocorticoide (por ejemplo, prednisona o dexametasona).

En algunas realizaciones típicas, el agente inmunomodulador es un agente antiinflamatorio, tal como derivados arilcarboxílicos, derivados que contiene pirazol, derivados de oxicam y derivados de ácido nicotínico. Las clases de agentes antiinflamatorios incluyen, por ejemplo, inhibidores de la ciclooxigenasa, inhibidores de 5-lipoxigenasa y antagonistas de los receptores de leucotrienos. En algunas realizaciones, el agente inmunomodulador es una citocina tal como G-CSF, GM-CSF o IL-2.

Los inhibidores de la ciclooxigenasa adecuados incluyen ácido meclofenámico, ácido mefenámico, carprofeno, diclofenac, diflunisal, fenbufeno, fenoprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, nabumetona, naproxeno, sulindac, tenoxicam, tolmetina y ácido acetilsalicílico.

Los inhibidores de lipoxigenasa adecuados incluyen inhibidores rédox (por ejemplo, derivados de catecol-butano, ácido nordihidroguaiarético (NDGA), masoprocol, fenidona, lanopalén, indazolinonas, nafazatrom, benzofuranol, alquilhidroxilamina) e inhibidores no rédox (por ejemplo, hidroxitiazoles, metoxialquiltiazoles, benzopiranos y sus derivados, metoxitetrahidropirano, ácidos boswéllicos y derivados acetilados de ácidos boswéllicos, y ácidos quinolinometoxifenilacéticos sustituidos con radicales cicloalquilo), y precursores de los inhibidores rédox.

Otros inhibidores de la lipoxigenasa adecuados incluyen antioxidantes (por ejemplo, fenoles, propilgalato, flavonoides y/o sustratos de origen natural que contienen flavonoides, derivados hidroxilados de flavonas, flavonol, dihidroquercetina, luteolina, galangina, orobol, derivados de chalcona, 4,2',4'-trihidroxichalcona, *orto*-aminofenoles, *N*-hidroxiureas, benzofuranos, ebselen y especies que aumentan la actividad de las selenoenzimas reductoras), agentes quelantes de hierro (por ejemplo, ácidos hidroxámicos y derivados de los mismos, *N*-hidroxiureas, 2-bencil-1-naftol, catecoles, hidroxilaminas, carnosol trolox C, catecol, naftol, sulfasalazina, zileutón, ácido 5-hidroxiantranílico y ácidos 4-(omega-arilalquil)fenilalcanoicos), compuestos que contienen imidazol (por ejemplo, quetoconazol e itraconazol), fenotiazinas y derivados de benzopirano.

Otros inhibidores de la lipoxigenasa adecuados más incluyen inhibidores de eicosanoides (por ejemplo, ácido octadecatetraenoico, ácido eicosatetraenoico, ácido docosapentaenoico, ácido eicosahexaenoico y ácido docosahexaenoico y ésteres de los mismos, PGE1 (prostaglandina E1), PGA2 (prostaglandina A2), viprostol, ácido 15-monohidroxi-eicosatetraenoico, ácido 15-monohidroxi-eicosatrienoico y ácido 15-monohidroxi-eicosapentaenoico y leucotrienos B5, C5 y D5), compuestos de interferencia con los flujos de calcio, fenotiazinas, difenilbutilaminas, verapamil, fuscósida, curcumina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido 5,8,11,14-cicocatetrayenoico (ETYA), hidroxifenilretinamida, lonapalen, esculina, dietilcarbamazina, fenantrolina, baicaleína, proxicromil, tioéteres, dialilsulfuro y di-(1-propenil)sulfuro.

Los antagonistas de los receptores de leucotrienos incluyen calcitriol, ontazolast, Bayer Bay-x-1005, Ciba-Geigy CGS-25019C, ebselen, Leo Denmark ETH-615, Lilly LY-293111, Ono ONO-4057, Terumo TMK-688, Boehringer Ingelheim BI-RM-270, Lilly LY 213024, Lilly LY 264086, Lilly LY 292728, Ono ONO LB457, Pfizer 105696, Perdue Frederick PF 10042, Rhone-Poulenc Rorer RP 66153, SmithKline Beecham SB-201146, SmithKline Beecham SB-201993, SmithKline Beecham SB-209247, Searle SC-53228, Sumitamo SM 15178, American Home Products WAY 121006, Bayer Bay-o-8276, Warner-Lambert CI-987, Warner-Lambert CI-987BPC-15LY 223982, Lilly LY 233569, Lilly LY-255283, MacroNex MNX-160, Merck y Co. MK-591, Merck y Co. MK-886, Ono ONO-LB-448, Purdue Frederick PF-5901, Rhone-Poulenc Rorer RG 14893, Rhone-Poulenc Rorer RP 66364, Rhone-Poulenc Rorer RP 69698, Shionoogi S-2474, Searle SC-41930, Searle SC-50505, Searle SC-51146, Searle SC-52798, SmithKline Beecham SK&F-104493, Leo Denmark SR-2566, Tanabe T-757 y Teijin TEI-1338.

La invención se describe en mayor profundidad en los siguientes ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la misma. Las líneas celulares descritas en los siguientes ejemplos se mantuvieron en cultivo de acuerdo con las condiciones especificadas por la colección americana de cultivos tipo (ATCC) o la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania (DMSZ), o como se conoce de otra manera. Los reactivos de cultivo celular se obtuvieron de Invitrogen Corp., Carlsbad, CA.

Ejemplos

1. Producción de derivados de anticuerpo anti-CD70 humanizado

Los anticuerpos anti-CD70 humanizados se generaron como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos N° 60/673.070, presentada el 19 de abril de 2005, y la publicación internacional PCT N° WO 2006/113909.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera del anticuerpo monoclonal murino anti-CD70, 1F6, y un derivado quimérico de 1F6, c1F6, son como se exponen en las SEC ID N°

1, 2, 21 y 22, respectivamente. (Véase también la solicitud de patente de EE.UU N° 60/645.355, presentada el 19 de enero DE 2005; y la publicación internacional PCT N° WO 2006/113909). Las secuencias aceptoras humanas para la humanización de c1F6 se seleccionaron de las secuencias V_H, J_H, V_K y J_K del exón de la línea germinal humana. Las secuencias aceptoras para la humanización del dominio V_H de c1F6 se seleccionaron de los exones de V_H de la línea germinal V_H1-18 (Matsuda *et al.*, 1993, *Nature Genetics* 3:88-94) o V_H1-2 (Shin *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10:3641-3645) y el exón de J_H J_H-6 (Mattila *et al.*, 1995, *Eur. J. Immunol.* 25:2578-2582). El exón de V_K de la línea germinal B3 (Cox *et al.*, 1994, *Eur. J. Immunol.* 24:827-836) y el exón de J_K J_K-1 (Hieter *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:1516-1522) se seleccionaron como secuencias aceptoras para la humanización del dominio V_L de c1F6. Las CDR murinas de 1F6, determinadas de acuerdo con la definición de Kabat, se insertaron en la plantilla de la línea germinal humana seleccionada. En resumen, se generaron oligonucleótidos sintéticos solapantes que abarcaban el dominio V_H o V_L humanizado y se usó la extensión por solapamiento PCR para ensamblar cada dominio. Los sitios de restricción incorporados en el producto de PCR se usaron para clonar direccionalmente los dominios V_H y V_L en un vector de expresión pCMV en marco con dominios constantes de IgG1 humana o dominio constante κ , respectivamente.

Se seleccionaron varias posiciones marco para la reintroducción de restos de donantes murinos. Estas fueron las posiciones H46, H67, H68, H69, H70, H71, H80, H81, H82, H82A y H91 en el dominio V_H, de acuerdo con la convención de numeración de Kabat. No se modificaron posiciones marco en el dominio V_L, aunque se seleccionaron los restos de CDR1 murinos en las posiciones L25 y L33 para la introducción del resto aceptor humano para esa posición.

Se generaron varios derivados de 1F6 humanizado mediante la incorporación de diferentes combinaciones de restos del marco del donante murino en el dominio V_H o restos de CDR humanos en el dominio V_L. Dichos derivados se resumen en la **Tabla 2** y la **Tabla 3** que se presentan a continuación.

Tabla 2

Derivado de V _H	Secuencia aceptora de exones de V _H	Restos del marco del donante
hV _H A	VH1-18	H71, H91
hV _H B	VH1-18	H71
hV _H C	VH1-18	H91
hV _H D	VH1-18	ninguno
hV _H E	VH1-2	ninguno
hV _H F	VH1-18	H67, H68, H69, H70, H71
hV _H G	VH1-18	H80, H81, H82, H82A
hV _H H	VH1-18	H67, H68, H69, H70, H71, H80, H81, H82, H82A
hV _H I	VH1-18	H46, H71, H91
hV _H J	VH1-2	H46
hV _H K	VH1-2	H71
hV _H L	VH1-2	H46, H71
hV _H M	VH1-18	H46, H67, H68, H69, H70, H71
hV _H N	VH1-18	H69, H70, H71, H80

Tabla 3

Derivado de V _L	Resto de CDR del aceptor
hV _L A	ninguno
hV _L B	L25
hV _L C	L33
hV _L D	L25, L33

II. Actividad in vitro de derivados de anticuerpo 1F6 humanizado

1. Afinidad de unión

- 5 Se expresaron transitoriamente los derivados de anticuerpo 1F6 humanizado HDLA (hV_HD y HV_LA), HHLA (hV_HH y hV_LA) y HJLA (Hv_HJ y HV_LA) y c1F6 en células 293, marcadas con europio usando el quelato de Eu-N1 yodoacetamido (Perkin Elmer), y se analizaron en cuanto a la unión de saturación con un grupo de líneas celulares positivas en CD70 como se describe detalladamente en la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/673.070, presentada el 19 de abril de 2005; y la publicación internacional PCT N° WO 2006/113909. Los resultados se muestran a

10 continuación en la **Tabla 4**.

Tabla 4

Línea celular	Antígeno/célula	Afinidad de unión aparente K _D (nM)			
		c1F6	h1F6 HDLA	h1F6 HHLA	h1F6 HJLA
ACHN	30.000	0,30	1,44	0,29	0,68
Caki-1	235.000	1,28	1,29	1,22	1,36
Caki-2	99.000	0,26	0,86	0,15	0,37
786-O	252.000	0,56	0,55	0,28	0,46

- 15 Los valores de K_D para los derivados de 1F6 humanizado fueron muy similares a c1F6 en todas las líneas celulares ensayadas, lo que confirma que el proceso de humanización no redujo significativamente la actividad de unión al antígeno.

2. Actividad de ADCC

- 20 Se midió la capacidad de los derivados de anticuerpo 1F6 humanizado HHLA, HJLA y HELA para mediar el ADCC contra líneas celulares CD70⁺ usando un ensayo de liberación de ⁵¹Cr convencional como se describe detalladamente en la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/673.070, presentada el 19 de abril 2005; y la publicación internacional PCT N° WO 2006/113909. Los derivados de 1F6 humanizado lisaron células diana CD70⁺ de una manera dependiente de la dosis, mientras que el anticuerpo CD70 murino m1F6 y la Ig humana de control sin unión no fueron eficaces

25

3. Actividad de CDC

- 30 Se examinó la capacidad del derivado de anticuerpo 1F6 humanizado HJLA para mediar el CDC en líneas celulares CD70⁺ como se describe detalladamente en la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/673.070, presentada el 19 de abril de 2005, y la publicación internacional PCT N° WO 2006/113909. Usando dicho ensayo, c1F6 y el derivado de 1F6 humanizado HJLA. Mediaron la lisis dependiente de la dosis de las células diana CD70⁺ de una manera equivalente.

4. Actividad de ADCP

- 35 Se examinó la capacidad del derivado de anticuerpo 1F6 humanizado HJLA para mediar la fagocitosis en la línea de carcinoma de células renales CD70⁺ 786-O como se describe detalladamente en la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/673.070, presentada el 19 de abril de 2005, y la publicación internacional PCT N° WO 2006/113909. Usando dicho ensayo, c1F6 y el derivado de 1F6 humanizado HJLA, pero no un anticuerpo de control sin unión, facilitaron la fagocitosis de las células diana CD70⁺ de una manera dependiente de la dosis de anticuerpo y en un grado equivalente.

40

5. Citotoxicidad

- 45 Se evaluaron conjugados de fármaco de derivados de anticuerpo 1F6 humanizado en cuanto a la actividad citotóxica *in vitro* como se describe detalladamente en la solicitud de patente de EE.UU. N° 60/673.070, presentada el 19 de abril de 2005, y la publicación internacional PCT N° WO 2006/113909. Se expresaron transitoriamente los derivados de 1F6 humanizado HELA (hV_HE y Hv_LA), HHLA, HJLA y HMLA (hV_HM y Hv_LA), y c1F6 en células 293, se conjugaron a vcMMAF (descrito en la solicitud de patente de EE.UU. N° 10/983.340; publicada como publicación de patente de EE.UU. N° 2005/0238649, el 27 de octubre de 2005) a un nivel de carga de ocho unidades de fármaco por anticuerpo y se ensayó la citotoxicidad en dos líneas celulares CD70⁺. Los resultados se muestran a continuación en la **Tabla 5**.

50

Tabla 5

vcMMAF de h1F6	Nº de restos marco murinos	Cl ₅₀ de Caki-1 [ng/ml]	Cl ₅₀ de 786-O [ng/ml]
	0	3,4 (media = 2,87, n = 3)	5,2 (media = 3,9, n = 3)
HHLA-F8 de h1F6	9	1,4 (media = 1,87, n = 3)	2,3 (media = 1,93, n = 3)
HJLA-F8 de h1F6	1	2,2 (media = 2,3, n = 3)	3,4 (media = 3,03, n = 3)
HMLA-F8 de h1F6	6	1,8 (media = 2,07, n = 3)	2,8 (media = 2,03, n = 3)
c1F6(293)-F8	0	1,8 (media = 2,17, n = 3)	2,4 (media = 1,45, n = 3)

Los valores de Cl₅₀ para los cuatro derivados humanizados fueron el doble de c1F6 en ambas líneas celulares ensayadas.

5

III. Actividad *in vivo* de los conjugados de anticuerpo 1F6 humanizado y fármaco

1. Modelo de carcinoma de células renales 786-O en ratones desnudos

- 10 Se expresaron transitoriamente derivados de anticuerpo 1F6 humanizado HDLA, HHLA, HJLA y HELA en células 293, se conjugaron con mcMMAF (descrito en la solicitud de patente de EE.UU. Nº. 10/983.340; publicada como publicación de patente de EE.UU. Nº 2005/0238649, el 27 de octubre de 2005) a un nivel de carga de ocho unidades de fármaco por anticuerpo y se evaluó la eficacia *in vivo* en un modelo de tumor sólido de carcinoma de células renales 786-O en ratones desnudos como se describe detalladamente en la solicitud de patente de EE.UU. Nº 60/673.070, presentada el 19 de abril de 2005, y la publicación internacional PCT Nº WO 2006/113909. Los resultados indicaron que el volumen del tumor se redujo en gran medida en todos los ratones tratados con conjugado de anticuerpo y fármaco en comparación con los ratones no tratados, y la eficacia de todos los derivados de 1F6 humanizado conjugados a mcMMAF fue comparable a la de mcMMAF de c1F6.

20 2. Modelos de xenoinjerto en ratones SCID de linfoma diseminado y mieloma múltiple

- Se evaluó el derivado de 1F6 humanizado HJLA en cuanto a su actividad antitumoral *in vivo* en modelos murinos de xenoinjerto de linfoma diseminado y mieloma múltiple como se describe detalladamente en la solicitud de patente de EE.UU. Nº 60/673.070, presentada el 19 de abril de 2005, y la publicación internacional PCT Nº WO 2006/113909. Los resultados mostraron que en cada modelo de tumor, la supervivencia de los ratones tratados con derivado de 1F6 humanizado HJLA se prolongó significativamente en comparación con la de los ratones no tratados o los ratones que recibieron el anticuerpo de control sin unión. En los xenoinjertos de mieloma múltiple, se examinó el nivel de proteína monoclonal derivada del tumor (cadena ligera λ) en el suero de ratones individuales. Las concentraciones de cadena ligera λ en circulación fueron significativamente inferiores en los ratones tratados con derivado de 1F6 humanizado HJLA en comparación con los ratones no tratados, coincidiendo con el aumento de las tasas de supervivencia de los ratones.

3. Supresión *in vitro* de linfocitos T específicos del antígeno CD70⁺

- 35 Se analizó la capacidad de derivado de anticuerpo 1F6 humanizado HJLA para agotar los linfocitos T activados específicos del antígeno como se describe detalladamente en la solicitud de patente de EE.UU. Nº 60/673.070, presentada el 19 de abril de 2005, y la publicación internacional PCT Nº WO 2006/113909. La adición del derivado de 1F6 humanizado HJLA limitó significativamente la expansión de las células CD8⁺/V β 17⁺ específicas del antígeno de una manera dependiente de la dosis de anticuerpo. Dichos resultados mostraron que 1F6 humanizado se dirige selectivamente y evita la expansión de los linfocitos T activados por el antígeno. Dicha actividad se invirtió en gran medida al bloquear los receptores Fc γ RIII con un anticuerpo específico anti-CD16, lo que indica que la supresión de las células reactivas con el péptido fue mediada a través de la interacción del anticuerpo 1F6 humanizado con células efectoras que portaban Fc γ RIII.

45 4. El anticuerpo anti-CD70 no afecta a las células espectadoras negativas en antígeno

- Se determinó el efecto de agotamiento mediado por 1F6 en los linfocitos T espectadores negativos en el antígeno como se describe detalladamente en la solicitud de patente de EE.UU. Nº 60/673.070, presentada el 19 de abril de 2005, y la publicación internacional PCT Nº WO 2006/113909. Como se muestra anteriormente, c1F6 y los derivados de anticuerpo 1F6 humanizado fueron comparables en la afinidad de unión, la capacidad para mediar funciones efectoras y la capacidad para agotar subconjuntos de linfocitos T CD8⁺ activados. El tratamiento con anticuerpo c1F6 no perturbó significativamente las representaciones relativas de otras familias de TCR V β CD8⁺ o CD4⁺; no se observó la eliminación de ningún grupo. Dichos datos demostraron que la exposición a anticuerpos anti-CD70 agotó selectivamente los linfocitos T activados CD70⁺ sin causar daños colaterales detectables en las poblaciones de linfocitos T espectadores.

55

IV. Producción de variantes de derivado de h1F6 humanizado HJLA

Se preparan conjugados de anticuerpo y fármaco mediante la unión específica de sitio de fármacos citotóxicos en sitios con el anticuerpo conocido por interactuar con los receptores Fc γ (Fc γ R). La unión del fármaco específica de sitio se realiza a través de la modificación de uno (o más) restos de anticuerpo mediante la sustitución de aminoácidos con uno o más aminoácidos no conservadores. En una variación de dicha metodología, la unión del fármaco específica del sitio se realiza a través de la modificación de uno (o más) restos de anticuerpo con uno o más restos de cisteína y el acoplamiento de fármacos citotóxicos usando reactivos específicos de tiol tales como derivados de maleimida de fármacos. Como alternativa, se realiza el bloqueo específico del sitio de la unión de Fc γ R mediante el diseño por ingeniería genética de un sitio para la glucosilación ligada a N en Fc o cerca del sitio que interactúa con Fc γ R. Dichas metodologías se resumen en general de la siguiente manera:

La siguiente metodología se usa para reemplazar uno o más aminoácidos en o la proximidad de un dominio Fc implicado en la interacción de unión con uno o más receptores Fc γ :

- i) seleccionar restos clave que participan en la interacción de unión entre los receptores Fc γ y los dominios Fc;
- ii) mutar uno (o más) resto de contacto (clave) (reemplazar un aminoácido con un aminoácido no conservador);
- iii) expresar la variante de anticuerpo en un mamífero hospedador y purificar;
- iv) acoplar un derivado de maleimida de uno o varios fármacos citotóxicos (por ejemplo, un enlazador de maleimida acoplado a un fármaco citotóxico) a al menos algunas de otras cisteínas accesibles al disolvente;
- v) medir la unión de ADC con Fc γ R (véase, por ejemplo, Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604);
- vi) caracterizar la actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* de ADC (véase, por ejemplo, Doronina *et al.*, 2003, *Nat Biotechnol.* 21:778-784 y Francisco *et al.*, 2003, "Blood" 102:1458-1465).

La siguiente metodología se usa para introducir uno o más restos de cisteína en o la proximidad de un dominio Fc implicado en la interacción de unión con uno o más receptores Fc γ :

- i) seleccionar restos clave que participan en la interacción de unión entre Fc γ R y los dominios Fc;
- ii) mutar uno (o más) resto de contacto (clave) a cisteína (una cisteína diseñada por ingeniería genética);
- iii) expresar la variante de anticuerpo en un mamífero hospedador y purificar;
- iv) acoplar derivado de maleimida de fármacos citotóxicos (por ejemplo, un enlazador de maleimida acoplado a un fármaco citotóxico) al/ a los resto/s de cisteína diseñado/s por ingeniería genética y, opcionalmente, al menos alguna de otras cisteínas accesibles al disolvente;
- v) determinar la unión del ADC variante con Fc γ R según lo descrito, por ejemplo, por Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604);
- vi) caracterizar la actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* de ADC (véase, por ejemplo, Doronina *et al.*, 2003, *Nat Biotechnol.* 21:778-784 y Francisco *et al.*, 2003, "Blood" 102:1458-1465).

La siguiente metodología se usa para introducir uno o más sitios para la glucosilación ligada a N en o la proximidad de un dominio Fc implicado en la interacción de unión con uno o más receptores Fc γ :

- vii) seleccionar restos clave que participan en la interacción de unión entre receptores Fc γ y dominios Fc;
- viii) mutar un grupo de tres restos para crear un sitio de glucosilación ligado a N: asparagina-cualquier aminoácido (X)-serina o asparagina-X-treonina, donde X no es prolina;
- ix) expresar la variante de anticuerpo en un hospedador mamífero y purificar;
- x) determinar si los sitios de glucosilación de consenso se utilizan en el hospedador mamífero para la unión del carbohidrato;
- xi) acoplar un derivado de maleimida de fármaco/s citotóxico/s (por ejemplo, un enlazador de maleimida acoplado a un fármaco citotóxico) a al menos alguna de otras cisteínas accesibles al disolvente;
- xii) medir la unión del ADC con Fc γ R (véase, por ejemplo, Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604);
- xiii) caracterizar la actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* de ADC (véase, por ejemplo, Doronina *et al.*, 2003, *Nat Biotechnol.* 21:778-784 y Francisco *et al.*, 2003, "Blood" 102:1458-1465).

En dichos estudios, los restos implicados en la interacción de unión entre los receptores Fc γ y los dominios Fc se pueden identificar, por ejemplo, como aquellos restos que participan funcionalmente en la unión del receptor Fc γ -dominios Fc. (Véase, en general, Shields *et al.*, 2001, *J. Biol. Chem.* 276: 6591-6604). Los restos que participan en la interacción de unión entre los receptores Fc γ y los dominios Fc también se pueden identificar como los presentes en la superficie de contacto estructural. (Véase, en general, Sondermann *et al.*, 2000, *Nature* 406(6793): 267-73).

Los siguientes estudios descritos en el presente documento ilustran los efectos de prevención o reducción de la interacción de un ADC con Fc γ R en la eficacia *in vitro* e *in vivo* de ADC anti-CD70. Se modificó un anticuerpo 1F6 humanizado mediante: i) la sustitución del dominio constante de IgG1 con los dominios constantes de IgG2 o IgG4; o ii) la mutación de restos de aminoácido en el dominio Fc del dominio constante de IgG1 conocido por su importancia para la unión a Fc γ R.

1. Variantes de isotipos

Se seleccionó el derivado de anticuerpo 1F6 humanizado HJLA (hV_HJ y hV_LA) como plantilla para la modificación del dominio Fc como se describe más adelante. Como se ha descrito anteriormente en detalle, el derivado 1F6 humanizado HJLA contiene la cadena pesada variable hV_HJ fusionada a dominios constantes de IgG1 humana y la cadena ligera variable hV_LA fusionada a un dominio constante κ. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena pesada variable hV_HJ de h1F6 se proporcionan en las SEC ID N° 13 y 14, respectivamente, y las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena pesada variable hV_HJ de h1F6 fusionada a los dominios constantes de IgG1 humana se proporcionan en las SEC ID N° 15 y 16, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera variable hV_LA de h1F6 se proporcionan en las SEC ID N° 23 y 24, respectivamente, y las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena ligera variable hV_LA de h1F6 fusionada al dominio constante κ se proporcionan en las SEC ID N° 25 y 26, respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanos se muestran en la **Figura 2**.

Las variantes de isotipo del derivado de anticuerpo 1F6 humanizado HJLA, en el que se sustituyó el dominio constante de IgG1 con el dominio constante de IgG2 o IgG4, se generaron en general como se ha descrito anteriormente, a excepción del uso de regiones constantes de IgG2 o IgG4 humanas.

Las secuencias de aminoácidos de las variantes de isotipo de IgG2 e IgG4 del derivado de h1F6 HJLA se muestran en la **Figura 3**.

De manera similar, se pueden generar variantes de isotipo adicionales de los anticuerpos anti-CD70 humanizados (por ejemplo, h1F6), incluyendo, por ejemplo, las variantes del isotipo IgG1 en las que se reemplazan partes del dominio constante de IgG1 en la proximidad del dominio Fc que participa en la interacción de unión con uno o más receptores FcγR por los dominios análogos de IgG2, IgG3 o IgG4.

2. Variantes del dominio Fc

Se generaron variantes del derivado del anticuerpo 1F6 humanizado HJLA, en las que se mutaron los restos de aminoácido del dominio Fc de IgG1 conocidos por su importancia para la unión a FcγR para afectar a la unión a uno o más FcγR, usando técnicas convencionales de biología molecular.

Se generaron dos variantes de h1F6 modificadas por ingeniería genética. IgG1v1 de h1F6 contiene las siguientes mutaciones: E233P:L234V:L235A, que perjudican enormemente a la unión a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIA, pero tienen un impacto mínimo en la unión a FcRn (Armour *et al.*, 1999, *Eur. J. Immunol.* 29:2613-24). IgG4v3 de h1F6 contiene las siguientes mutaciones: S228P:L235A:G237A:E318A (Hutchins *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 92:11980-4). La mutación S228P crea la bisagra "de tipo IgG1" (CPPC), que favorece el apareamiento de enlaces disulfuro entre cadenas pesadas frente al que se produce dentro de cada cadena pesada (Angal *et al.*, 1993, *Mol. Immunol.* 30:105-108; Bloom *et al.*, 1997, *Protein Sci.* 6:407-415). Se sabe que las mutaciones de alanina afectan a la unión a FcγRI y C1q (Hutchins *et al.*, *Supra*).

Las secuencias de aminoácidos de las variantes de los dominios Fc de IgG1 e IgG4 del derivado de h1F6 HJLA (IgG1v1 e IgG4v3) se muestran en la **Figura 4**.

Es posible generar de una manera similar variantes adicionales del dominio Fc de los anticuerpos anti-CD70 humanizados (por ejemplo, h1F6), incluyendo, por ejemplo, variantes del dominio Fc con una o más sustituciones no conservadoras de aminoácidos, la introducción de uno o más restos de cisteína, o la introducción de uno o más sitios de glucosilación ligada a N, en o en la proximidad del dominio Fc implicado en la interacción de unión a uno o más Fcγ.

La **Figura 5** es un diagrama esquemático que representa la estructura de las variantes del anticuerpo anti-CD70 humanizado (h1F6). G1, G2 y G4 indican anticuerpos que tienen los dominios constantes de los isotipos IgG1, IgG2 e IgG4, respectivamente. G1v1 indica la variante de IgG1 de h1F6 que tiene las sustituciones de aminoácidos E233P, L234V y L235A que dan lugar al deterioro de la unión de FcγR. G4v3 indica la variante de IgG4 de h1F6 que tiene las sustituciones de aminoácidos S228P, L235A, G237A y E318A que dan lugar al deterioro de la unión de FcγR.

Con el uso de dichos métodos y métodos similares, se pueden generar agentes de unión a la diana variantes que se unen a CD70 u otros antígenos diana.

V. Unión in vitro de anticuerpos h1F6 variantes con células que portan el receptor Fcγ

La expresión del receptor Fcγ (FcγR) está extendida en las células inmunes humanas normales y puede contribuir a la absorción en tejidos no diana de los ADC. Los anticuerpos de isotipo IgG1 humanos se unen con mayor eficacia a FcγR de lo que lo hacen los isotipos IgG4 e IgG2. Se predijo que la mutación de los restos de Fc implicados en la unión a FcγR, o la alteración del isotipo de Ig, reduce la localización de ADC en órganos no diana, lo que resulta en la reducción de la toxicidad, el aumento de las concentraciones de ADC en circulación y la mejora de la dirección hacia tumores. Se generó un grupo de ADC variantes de unión a Fc e isotipos de IgG de h1F6 para ensayar los efectos de la reducción de la unión a FcγR sobre la eficacia y la toxicidad de los ADC. Véase la **Figura 5**.

Ambos isotipos IgG2 e IgG4 interactuaron con los receptores Fcγ con menor afinidad que el isotipo IgG1 (véase la **Figura 6**).

Se desarrollaron ensayos basados en células para confirmar la reducción de la unión de anticuerpos h1F6 variantes con FcγRI y FcγRIIIa humanos, y para demostrar que cada variante de h1F6 conserva la actividad de unión al antígeno.

Se evaluaron anticuerpos h1F6 variantes en cuanto a su actividad de unión al antígeno. En resumen, se redujo cada anticuerpo h1F6 variante y se marcó con maleimida 488 C₅ Alexa Fluor (AF488). A continuación, se combinaron las células 786-O positivas en CD70 (**Figura 6**) o células L428 positivas en CD70 (no mostradas) con diluciones en serie de cada anticuerpo marcado. Se detectaron las células marcadas usando un analizador FACS LSRII. Se analizaron los datos usando una ecuación de modelo de unión de un sitio usando Prisma v4.01. Los datos de afinidad de unión aparente (**Tabla 6**) indican que la modificación del isotipo de IgG (G1, G2, G4) o la mutación de la estructura de Fc (G1v1, G4v3) no afecta a la actividad de unión al antígeno.

Tabla 6

Sumario de la unión del anticuerpo h1F6 variante con líneas celulares 786-O y L428 CD70⁺						
	Células 786-O			Células L428		
	AF/Ac	K_D media	D. E.	AF/Ac	K_D media	D. E.
G1 de h1F6	3,4	1,27	0,121	3,4	0,311	0,017
G1v1 de h1F6	3,6	1,13	0,249	3,6	0,288	0,041
G2 de h1F6	4,4	0,95	0,309	4,4	0,110	0,031
G4 de de h1F6	4,2	1,14	0,339	4,2	0,253	0,058
G4v3 de h1F6	4,3	1,30	0,081	4,3	0,325	0,077

Usando dicho ensayo y ensayos similares, se pueden evaluar los agentes de unión a la diana variantes en cuanto a la unión a CD70 o a otros antígenos diana.

VI. Producción de líneas celulares CHO que expresan FcγRI y FcγRIIIa de forma estable

Se establecieron ensayos de unión competitiva basada en células para estudiar las interacciones de los anticuerpos h1F6 variantes con el receptor FcγI humano (FcγRI) y el receptor FcγRIIIa humano (FcγRIIIa).

Se expresaron de forma estable los receptores FcγRI y FcγRIIIa humanos de longitud completa en células CHO, y se aislaron las líneas celulares mediante clonación por dilución limitada. La Figura 7 muestra la expresión de superficie celular de FcγRIIIa en la línea celular parental, CHO DG44, y dos líneas celulares transfectadas de forma estable con un vector de expresión de FcγRIIIa de longitud completa, 158F y 158V. El FcγRIIIa de la superficie celular se analizó por FACS usando un anticuerpo contra FcγRIIIa humano conjugado con ficoeritrina (PE).

Usando estas u otras líneas celulares, se pueden evaluar los agentes de unión a la diana variantes en cuanto a la unión a células que expresan el receptor FcγRI y el receptor FcγRIIIa.

VII. Unión in vitro de anticuerpos h1F6 variantes con líneas celulares CHO que expresan FcγRI y FcγRIIIa de forma estable

Se determinó la unión del anticuerpo anti-CD70 humanizado (h1F6) con células CHO que expresan el FcγRIIIa de longitud completa mediante unión de saturación. Se incubaron la línea celular parental, CHO DG44, y dos líneas celulares transfectadas de forma estable con un vector de expresión de FcγRIIIa de longitud completa, 158F (baja afinidad) y 158V (alta afinidad) con anticuerpo h1F6 marcado con AF488. Se detectaron las células marcadas

usando un analizador de FACS LSRII. La Figura 8 muestra que el anticuerpo h1F6 se une a las células que expresan Fc γ RIIIa de longitud completa.

También se determinó la unión de anticuerpos anti-CD70 humanizados (h1F6) variantes a células CHO que expresaban Fc γ RIIIa de longitud completa mediante unión competitiva. Se combinó una línea celular CHO estable que expresaba Fc γ RIIIa humano, 158V, con diluciones en serie de IgG1 de h1F6 parental o variantes de h1F6 en presencia de IgG1 de h1F6 marcado con Alexa Fluor 488 100 nM. Las células marcadas se detectaron usando un analizador de FACS LSRII. Las interacciones de unión de IgG1 de h1F6 y las variantes con Fc γ RIIIa fueron comparables con las publicadas en la literatura. Solo IgG1 de h1F6 (triángulo abierto) interactuó significativamente con Fc γ RIIIa (**Figura 9**, panel izquierdo).

La conjugación de IgG1 de h1F6 con una carga media de 4 auristatinas MMAF/anticuerpo no afectó significativamente a la unión del anticuerpo con Fc γ RIIIa (**Figura 9**, compárense los paneles izquierdo y derecho).

Se determinó la unión del anticuerpo anti-CD70 humanizado (h1F6) con células CHO que expresan el Fc γ RI de longitud completa mediante unión competitiva. Se combinó una línea celular CHO estable que expresaba Fc γ RI humano con diluciones en serie de IgG1 de h1F6 parental o variantes de h1F6 en presencia de IgG1 de h1F6 marcado con Alexa Fluor 488 50 nM. Las células marcadas se detectaron usando un analizador de FACS LSRII. Las interacciones de unión de IgG1 de h1F6 y las variantes con Fc γ RI fueron comparables con las publicadas en la literatura. IgG1 de h1F6 (triángulo abierto) e IgG4 de h1F6 (triángulo abierto invertido) se unió a Fc γ RI con alta afinidad, mientras IgG2 de h1F6 y las variantes IgG1v1 e IgG4v3 de h1F6 (diamantes) se unieron con afinidad reducida y no mostraron ninguna interacción significativa (**Figura 10**, panel izquierdo).

La conjugación de IgG1 de h1F6, IgG1v1 de h1F6, IgG2 de h1F6, IgG4 de h1F6 o IgG4v3 de h1F6 con una carga media de 4 auristatinas MMAF/anticuerpo no afectó a la unión del anticuerpo a Fc γ RI (**Figura 10**, compárense los paneles izquierdo y derecho).

Usando dichos ensayos y ensayos similares, es posible evaluar los agentes de unión a la diana variantes en cuanto a la unión a células que expresan los receptores Fc γ RI y Fc γ RIIIa.

VIII. Unión in vitro de conjugados de anticuerpo h1F6 variante y fármaco con líneas celulares CHO que expresan Fc γ RI y Fc γ RIIIa de forma estable

Se conjugaron IgG1 de h1F6 y las variantes de h1F6 con vcMMAF con una carga media de 4 fármacos/anticuerpo.

Usando los ensayos descritos anteriormente o variaciones de dichos ensayos, es posible evaluar los conjugados de agente de unión a la diana variante y fármaco en cuanto a la unión a células que expresan los receptores Fc γ RI y Fc γ RIIIa

IX. Eficacia in vitro de conjugados de anticuerpo h1F6 variante y fármaco

Se realizaron ensayos de inhibición del crecimiento en un panel de líneas celulares positivas en CD70: 786-O, Caki-1, L428, UMRC-3 y LP1, y una línea celular negativa en CD70: HCT-116. Se trataron las células con diluciones en serie de IgG1 de h1F6-vcMMAF(4), IgG1v1 de h1F6-vcMMAF(4), IgG2 de h1F6-vcMMAF(4), IgG4 de h1F6-vcMMAF(4) e IgG4v3 de h1F6-vcMMAF(4). No se observaron diferencias significativas en la citotoxicidad entre los conjugados de variante de h1F6 y fármaco en el panel de líneas celulares CD70⁺ (**Tabla 7**).

Tabla 7

Valores de CI₅₀ de los conjugados de h1F6 variante y vcMMAF(4) en panel de células CD70⁺						
ADC de h1F6 (Nº de receptores CD70)	786-O	Caki-1	L428	UMRC-3	LP-1	HCT-116 (CD70 ⁻)
G1v1 de h1F6-vcMMAF(4)	9	5	3	29	22	Sin efecto
G2 de h1F6-vcMMAF(4)	16	7	25	31	34	Sin efecto
G4 de h1F6-vcMMAF(4)	26	17	18	35	42	Sin efecto
G4v3 de h1F6-vcMMAF(4)	22	8	14	26	28	Sin efecto
G1 de h1F6-vcMMAF(4)	8	6	3	34	21	Sin efecto

Usando dicho ensayo o ensayos relacionados, se pueden evaluar los conjugados de agente de unión a la diana variante y fármaco en cuanto a la actividad citotóxica sobre células que expresan el antígeno diana.

X. Conjugados de anticuerpo h1F6 variante y fármaco con restos de cisteína introducidos

Se prepararon variantes de anticuerpo 1F6 humanizado mediante la mutación de restos de aminoácidos en el dominio Fc de IgG1 que participan en la unión del dominio Fc con Fc γ R. Las mutaciones se generaron usando técnicas de biología molecular convencionales.

Se generaron seis variantes de h1F6 diseñadas por ingeniería genética. G236C de IgG1 de h1F6 contiene una glicina en la sustitución de cisteína de la posición 236; P238C de IgG1 de h1F6 contiene una prolina en la sustitución de cisteína de la posición 238; S239C de IgG1 de h1F6 contiene una serina en la sustitución de cisteína de la posición 239; D265C de IgG1 de h1F6 contiene un aspartato en la sustitución de cisteína de la posición 265; E269C de IgG1 de h1F6 contiene un glutamato en la sustitución de cisteína de la posición 269; y A327C de IgG1 de h1F6 contiene una alanina en la sustitución de cisteína de la posición 327. Los anticuerpos se purificaron mediante métodos convencionales.

Se desarrollaron ensayos basados en células para confirmar la reducción de la unión de cuatro de los anticuerpos h1F6 variantes con Fc γ RI y Fc γ RIIIa humanos, y para demostrar que cada h1F6 variante conserva la actividad de unión al antígeno. La variante de anticuerpo S239C se conjugó con vcMMAF como se ha descrito anteriormente, pudiéndose conjugar como se describe en la solicitud publicada de EE.UU. N° 2007-092940 o Givol et al. (*Supra*).

Se evaluaron los anticuerpos h1F6 variantes en cuanto a la actividad de unión al antígeno como se ha descrito anteriormente. Los datos de afinidad de unión aparente (**Tabla 8**) indican que la introducción de sustituciones de cisteína en la región Fc no afectó sustancialmente a la unión.

Tabla 8

Afinidad de unión de mutantes cis anti-CD70		
Variantes anti-CD70 humanizadas (h1F6)	786-O	Unión a células
	K _D IgG (nM)	Cl ₅₀ IgGvcF2 Cl ₅₀ IgG
IgG1	0,6	1,3
S239C de IgG1	1,0	1,1
D265C de IgG1	1,1	0,9
E269C de IgG1	0,8	0,9
A327C de IgG1	0,5	1,1

Se determinó la unión de una de las variantes, S239C de IgG1, a células CHO que expresaban Fc γ RIIIa y Fc γ RI de longitud completa como se ha descrito anteriormente. Haciendo referencia a la **Figura 11**, la variante S239C de IgG1, bien no conjugada o conjugada a vcMMAF (promedio de 2 fármacos/anticuerpo) mostró una reducción de la unión con las células que expresaban Fc γ RIIIa, pero no con las células que expresaban Fc γ RI. El control, el anticuerpo h1F6 parental, se une a células que expresan Fc γ RIIIa y a células que expresan Fc γ RI.

Se pueden generar otras variantes del dominio Fc de manera similar, incluyendo, por ejemplo, variantes del dominio Fc con una o más sustituciones de aminoácido cisteína, por ejemplo, en las posiciones 234, 235, 237, 267, 298, 299, 326, 330 o 332. Usando los ensayos descritos, los agentes de unión a la diana variantes se pueden evaluar en cuanto a la unión a células que expresan los receptores Fc γ RIIIa y Fc γ RI.

XI. Eficacia in vivo de los conjugados de anticuerpo h1F6 variante y fármaco

Los datos de eficacia *in vivo* sugieren que la reducción de la unión a los Fc γ R mejora la potencia de un ADC. En un modelo de xenoinjerto de carcinoma de células renales, se inyectaron a ratones desnudos por vía subcutánea células 786-O y luego se trataron con una sola administración i.v. de 0,5 mg/kg (**Figura 12**, panel superior) o 1,5 mg/kg (**Figura 12**, panel inferior) de cada conjugado de anticuerpo anti-CD70 humanizado variante (h1F6) y fármaco una vez que el volumen medio del tumor hubo alcanzado 100 mm³. La administración se realizó en nueve (9) animales de cada grupo de tratamiento, y seis (6) animales recibieron solo vehículo. Sorprendentemente, dicho estudio de eficacia *in vivo* indicó que: IgG1v1 de h1F6-vcMMAF4 (diamantes) tuvo una mayor eficacia que IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (triángulos); IgG2 de h1F6-vcMMAF4 (círculos) también tuvo una mayor eficacia que IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (triángulos); e IgG1v1 de h1F6-vcMMAF4 (diamantes) tuvo una mejor eficacia que IgG4v3 de h1F6-vcMMAF4 (cuadrados). A pesar de reducir en gran medida la unión a Fc γ RI de IgG4 de h1F6 (triángulos invertidos) y de IgG4v3 de h1F6 (cuadrados), los conjugados de fármaco de estas moléculas fueron menos eficaces que el conjugado de IgG1 de h1F6 parental (triángulos) y fármaco.

En la **Figura 13**, se muestra un segundo estudio *in vivo*. Los ratones desnudos, a quienes se inyectaron por vía subcutánea células de carcinoma de células renales 786-O, se trataron con una sola administración i.v. bien de 0,5 mg/kg o de 1,5 mg/kg de cada conjugado de variante de h1F6 y fármaco MMAF una vez que el volumen medio del tumor hubo alcanzado 100 mm³. La administración se realizó en nueve (9) animales de cada grupo de tratamiento, y seis (6) animales recibieron solo vehículo. Los estudios de eficacia *in vivo* indicaron que: IgG1v1 de h1F6-vcMMAF4 (diamantes) tuvo una mayor eficacia que IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (cuadrados); IgG2 de h1F6-vcMMAF4 (triángulos) también tuvo una mayor eficacia que IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (cuadrados); IgG4v3 de h1F6-vcMMAF4 (cruces) tuvo una eficacia equivalente a v1gG4 de h1F6-vcMMAF4 (círculos); e IgG1v1 de h1F6-vcMMAF4 (diamantes) tuvo una mejor eficacia que IgG4v3 de h1F6-vcMMAF4 (cruces).

En la **Figura 14**, se muestra un tercer estudio *in vivo*. Los ratones desnudos, que recibieron por inyección subcutánea células de carcinoma de células renales 786-O, se trataron con una sola administración i.v. bien de 1,5 mg/kg o de 4,5 mg/kg de cada conjugado de variante de h1F6 y fármaco mcMMAF una vez que el volumen medio del tumor hubo alcanzado 100 mm³. Los estudios de eficacia *in vivo* indicaron que: IgG1v1 de h1F6-mcMMAF4 (diamantes) tuvo una mayor eficacia que IgG1 de h1F6-mcMMAF4 (triángulos); IgG2 de h1F6-mcMMAF4 (cuadrados) también tuvo una mayor eficacia que IgG1 de h1F6-mcMMAF4 (triángulos).

Se realizó un cuarto estudio *in vivo* para evaluar la diferencia de actividad de los conjugados de anticuerpo h1F6 variante y fármaco en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de células renales CD70⁺ diferente. Se inyectaron células de carcinoma de células renales UMRC-3 en tumores de ratones desnudos; los tamaños de dichos tumores se pueden reducir significativamente mediante el tratamiento con conjugados de anticuerpo h1F6-fármaco MMAF, pero no con anticuerpo h1F6 sin conjugar (véase la **Figura 15**). Los ratones desnudos recibieron por inyección subcutánea células de carcinoma de células renales UMRC-3. El tratamiento con las cantidades indicadas de anticuerpo se inició cuando el volumen tumoral hubo alcanzado aproximadamente 100 mm³. Los animales recibieron la administración i.v. q4dx4 sin anticuerpo (no tratado) de 1 mg/kg de 1F6vcMMAF4, 3 mg/kg de 1F6vcMMAF4, 1 mg/kg de 1F6G1v1 vcMMAF4, 3 mg/kg de 1F6G1v1vcMMAF4, 1 mg/kg de 1F6G2vcMMAF4, 3 mg/kg de 1F6G2vcMMAF4, 1 mg/kg de 1F6G4vcMMAF4, 3 mg/kg de 1F6G4vcMMAF4, 1 mg/kg de 1F6G4v3vcMMAF4 o 3 mg/kg de 1F6G4v3vcMMAF4. El punto final medido del estudio fue el volumen tumoral. Para determinar la farmacocinética *in vivo* de los anticuerpos h1F6 variantes, se extrajo sangre (safena, 20 µl) de cada grupo inmediatamente antes de cada dosis, y después de 1 h, 6 h, 2 d y 4 d de la cuarta dosis.

En un estudio relacionado, los animales recibieron la administración q4dx4 i.v. sin anticuerpo (no tratado) de 3 mg/kg de 1F6vcMMAF4, 6 mg/kg de 1F6vcMMAF4, 3 mg/kg de 1F6G1v1vcMMAF4, 6 mg/kg de 1F6G1v1vcMMAF4, 3 mg/kg de 1F6G2vcMMAF4, 6 mg/kg de 1F6G2vcMMAF4, 3 mg/kg de 1F6G4vcMMAF4, 3 mg/kg de 1F6G4vcMMAF4, 3 mg/kg de 1F6G4v3vcMMAF4 o 6 mg/kg de 1F6G4v3vcMMAF4. El punto final medido del estudio fue el volumen tumoral. Para determinar la farmacocinética *in vivo* de los anticuerpos h1F6 variantes, se extrajo sangre (safena, 20 µl) de cada grupo inmediatamente antes de cada dosis, y después de 1 h, 6 h, 2 d y 4 d de la cuarta dosis.

Haciendo referencia a la **Figura 16A**, los estudios de eficacia *in vivo* indicaron que: h1F6-vcMMAF4 y todos los ADC variantes tuvieron una eficacia similar a dosis de 1 mg/kg. Por el contrario, a 3 mg/kg, IgG2-vcMMAF4 (diamantes) o IgG4-vcMMAF4 (círculos) tuvieron una eficacia algo mejor en comparación con IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (triángulos abiertos), IgG4v3 de h1F6-vcMMAF4 (círculos cerrados) e IgG1v1 de h1F6-vcMMAF4 (cerrados triángulos) y el control IgG4 de 1F6-vcMMAF4 (cruces).

Haciendo referencia a la **Figura 16B**, los estudios de eficacia *in vivo* indicaron que: a 3 mg/kg de IgG1v1 de h1F6-vcMMAF4 (triángulos cerrados) se produjo la mejor eficacia, mientras que IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (triángulos abiertos), IgG2 de h1F6-vcMMAF4 (diamantes), IgG4 de h1F6-vcMMAF4 (círculos) e IgG4v3 de h1F6-vcMMAF4 (círculos cerrados) tuvieron eficacias similares pero algo mejores. A 6 mg/kg de IgG1 de h1F6-vcMMAF4 y todos los anticuerpos variantes mostraron eficacias similares.

Con el uso de dichos ensayos o ensayos relacionados, se pueden evaluar los conjugados de agente de unión variante y fármaco en cuanto a la eficacia *in vivo* contra tumores que expresan el antígeno diana.

XII. Dosis máximas toleradas de los conjugados de anticuerpo h1F6 variante y fármaco en ratones

Para determinar la dosis máxima tolerada (MTD) de los anticuerpos variantes, grupos de ratones Balb/c (n = 3) recibieron la inyección de 40, 60 o 80 mg/kg de ADC variantes a través de la vena de la cola para determinar la dosis máxima tolerada de una sola dosis. Los ratones fueron monitorizados diariamente durante 14 días, y se registraron el peso y las observaciones clínicas. Los ratones que desarrollaron signos significativos de sufrimiento fueron sacrificados.

El anticuerpo anti-CD70, h1F6, se une a CD70 humano, pero no reacciona de forma cruzada con el antígeno correspondiente de los ratones. Por lo tanto, se puede explorar en ratones la toxicidad independiente del antígeno pero no la dependiente del antígeno de los ADC anti-CD70. Todos los ADC fueron tolerados a ≥ 40 mg/kg, siendo ligeramente mejor tolerado IgG2-F4 (≥ 60 mg/kg). Así pues, IgG2-F4 e IgG1v1-F4 tienen un índice terapéutico que

se ha mejorado en al menos el doble en comparación con los ADC de IgG1 parental-F4.

XIII. Farmacocinética in vivo de los conjugados de anticuerpo h1F6 variante y fármaco

- 5 En el estudio descrito en el Ejemplo X, se extrajo sangre de tres (3) ratones tratados con la dosis de 1,5 mg/kg de cada conjugado de anticuerpo h1F6 variante y fármaco vcMMAF 1 hora, 1 d, 7 d y 14 d después de la administración del fármaco. Se midieron las concentraciones en suero de los conjugados de anticuerpo-fármaco en dichos puntos temporales usando un ELISA de unión anti-idiotipo.
- 10 En referencia a la **Figura 17**, IgG1v1 de h1F6-vcMMAF4 (triángulos) e IgG2 de h1F6-vcMMAF4 (triángulos invertidos) se eliminaron más lentamente de la circulación en comparación con IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (cuadrados). IgG4 de h1F6-vcMMAF4 (diamantes) e IgG4v3 de h1F6-vcMMAF4 (círculos) también se eliminaron más lentamente de la circulación en comparación con IgG1 de h1F6-vcMMAF4 (cuadrados). La eliminación más rápida de IgG4 humana en comparación con IgG1 o IgG2 humanas de la circulación del ratón no fue inesperada, ya que se ha observado previamente (Zuckier *et al*, 1994, *Cancer* 73: 794-799). La eliminación más rápida de los conjugados de IgG4 e IgG4v3-fármaco de la circulación del ratón en comparación con los conjugados de IgG1, IgG2 e IgG1v1-fármaco probablemente se produce a través de mecanismos independientes de FcγR. Los datos de eliminación también se resumen en la Tabla 9. Como se ilustra en la tabla, la mejora de la potencia de los conjugados de variante de IgG1v1 e IgG2-fármaco se correlaciona con la exposición (AUC).
- 20 La reducción de la unión a FcγR mediante la modificación por ingeniería genética del dominio Fc de IgG1 puede mejorar la eficacia y, potencialmente, la ventana terapéutica, mediante la reducción de la absorción de órganos no diana, aumentando así las concentraciones en circulación de los conjugados de anticuerpo y fármaco, y mejorando la absorción tumoral.
- 25 Usando dicho ensayo o un ensayo relacionado, se pueden evaluar los conjugados de agente de unión variante y fármaco en cuanto a la farmacocinética *in vivo*.

Tabla 9

Seguridad y farmacocinética de los conjugados de anticuerpo-fármaco					
	IgG1-F4	IgG1v1-F4	IgG2-F4	IgG4-F4	IgG4v3-F4
Seguridad					
MTD (mg/kg)*	≥ 40	≥ 40	≥ 60	≥ 40	≥ 40
Variables farmacocinéticas†					
T _{1/2} (días)	5,4 ± 1,1	5,3 ± 0,7	5,9 ± 1,2	2,8 ± 0,3	3,7
AUC (día-mg/ml)	200 ± 23	432 ± 19	469 ± 115	204 ± 74	97
Eliminación (ml/día/kg)	51 ± 5	23 ± 1	23 ± 5	61 ± 17	103

XIV. Distribución tisular in vivo de los conjugados de anticuerpo h1F6 variante y fármaco

- Se examinó la distribución tisular *in vivo* de conjugados de h1F6 humanizado y anticuerpo h1F6 variante-fármaco (ADC). Los ratones recibieron mediante inyección por vía subcutánea células de carcinoma renal 786-O como se ha descrito anteriormente, y luego se administraron por vía intravenosa 1,5 mg/kg de G1 de h1F6-vc[³H]MMAF o G1v1 de h1F6-vc[³H]MMAF. A las 4 horas, 1 día y 3 días después de la inyección, se midieron el [³H]MMAF libre y el ADC de [³H]MMAF en el suero, tumor y los tejidos (es decir, hígado, riñón, intestino, contenido intestinal y bazo). Se homogenizaron el tumor y los tejidos en presencia de metanol (es decir, el ADC de [³H]MMAF precipita). La suspensión contiene fármaco total (es decir, ADC de [³H]MMAF más [³H]MMAF), y el sobrenadante contiene fármaco libre (es decir, [³H]MMAF).
- La variante G1v1 de h1F6-vcMMAF apareció eliminarse del suero más lentamente que G1 de h1F6-vcMMAF en los tres puntos temporales (4 horas, 1 día y 3 días). (Cabe señalar que el ensayo mide tanto el MMAF libre como el MMAF conjugado al anticuerpo h1F6).
- El [³H]MMAF total apareció rápidamente en los tumores, estando la medición de las 4 horas cerca de los puntos temporales posteriores; el [³H]MMAF libre apareció en los tumores más lentamente. A las 4 horas, la mayor parte de [³H]MMAF apareció unido en el ADC, mientras que el [³H]MMAF dominó en los puntos temporales posteriores. A las 72 h, apareció más [³H]MMAF libre en los tumores de los ratones tratados con la variante de G1v1 de h1F6 en comparación con G1 de h1F6. Es posible que el aumento de la semivida de la variante G1v1 de h1F6-vc[³H]MMAF en la circulación contribuya a la mayor presencia de [³H]MMAF en los tumores.

A las cuatro horas, los ratones inyectados con la variante G1v1 de h1F6-vc^{[3]H}MMAF tenían significativamente menos fármaco (unido a ADC y libre) en el hígado y el intestino que los ratones inyectados con G1v1 de h1F6-vc^{[3]H}MMAF. Estas diferencias, sin embargo, se perdieron en los puntos temporales posteriores. Estos datos coinciden con el hecho de que el hígado es responsable de la degradación de los ADC tras la excreción biliar.

La variante G1v1 de h1F6-vcMMAF pareció eliminarse del riñón y del bazo más lentamente que G1 de h1F6-vcMMAF, de manera similar a los resultados obtenidos en el suero.

En resumen, mediante la medición de los ADC de ^{[3]H}MMAF, la variante G1v1 de h1F6 se elimina más lentamente de la circulación que G1 de h1F6, coincidiendo con la farmacocinética *in vivo*.

(Véase más adelante). En el tumor, aparece más ^{[3]H}MMAF libre a los 3 días de la inyección en el caso de G1v1 de h1F6 en comparación con G1 de h1F6, coincidiendo con una mayor potencia *in vivo*. La concentración más alta de ADC de ^{[3]H}MMAF en el suero parece ser un conductor para la concentración de fármaco libre tumoral superior. Se observaron niveles más bajos de ADC de ^{[3]H}MMAF y ^{[3]H}MMAF libre en el hígado, intestino y contenido del intestino a las 4 h de la administración de la variante G1v1 de h1F6 en comparación con G1 de h1F6. Por último, el riñón y el bazo tienen concentraciones de ADC de ^{[3]H}MMAF similares a las del suero, pero el fármaco libre a las 4 h es menor para la variante G1v1 de h1F6 en comparación con G1 de h1F6. Estos resultados coinciden con la reducción de la unión de un ADC a los receptores Fcγ, estando asociados con una mayor semivida en suero y el aumento de la acumulación del fármaco en el tumor.

Con el uso de dichos ensayos o ensayos relacionados, se pueden evaluar los conjugados de agente de unión variante y fármaco en cuanto a la biodistribución *in vivo*.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Seattle Genetics, Inc. McDonagh, Charlotte Carter, Paul Sussman, Dj ango

<120> Agentes de unión a la diana variantes y usos de los mismos

<130> 020-00102WO

<150> 60/872.239

<151> 01-12-2006

<150> 60/918.563

<151> 16-03-2007

<160> 39

<170> Patente versión 3.5

<210> 1

<211> 411

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

<400> 1

```

atggcttgggtgtggaccttgcctatctctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag      60
atccagttgg tgcagttctgg acctgaggtg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc      120
tgcaaggctt ctgggtat ac ct t caca aac t at ggaat ga actgggtgaa gcaggctcca      180
ggaaagggtt taaagtggat gggctggat a aacacctaca ctggagagcc aacat atgct      240
gatgccttca agggacgggt tgccttctct t tggaaacct ctgccagcac tgcctat t t g      300
cagatcaaca acctcaaaaa t gaggacacg gctacat at t tctgtgcaag agactacggc      360
gactatggta tggactactg ggggtcaagga acctcagtc a ccgtctctc c a      411

```

<210> 2

<211> 137

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 2

```

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1      5      10      15

Ala Gly Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys
      20      25      30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
      35      40

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50      55      60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
65      70      75      80

Asp Ala Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
      85      90      95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
      100      105      110

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
      115      120      125

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130      135

```

5 <210> 3
 <211> 1404
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDR murina, FR humana en dominio VH
 <400> 3

ES 2 523 915 T5

at ggct t ggg t gt ggacct t gct at t cct g at ggcagct g cccaaagt gc ccaagcacag	60
gt t cagct gg t gcagt ct gg agct gaggt g aagaagcct g gggcct cagt gaaggt ct cc	120
t gcaaggct t ct ggt t acac ct t t accaac t at ggaat ga act ggg t gcg acaggccccct	180
ggacaagggc t t gagt ggal gggat ggal c aacacct aca ct ggagagcc aacat at gct	240
gal gcct t ca agggcagagt caccat gacc acagacacat ccacgagcac agcct acat g	300
gagct gagga gcct ggal c t gacgacacg gccgt gt at t act gt gcgag agact acggc	360
gact at ggt a t ggact act g ggg t caagga accacct ca ccgt ct cct c agct agcacc	420
aagggcccat cgg t ct t ccc cct ggcaccc t cct ccaaga gcacct ct gg gggcacagcg	480
gccct gggct gcct ggt caa ggact act t c cccgaaccgg t gacgg t gt c gt ggaact ca	540
ggcgccct ga ccagcggcgt gcacacct t c ccggct gt cc t acagt cct c aggact ct ac	600
t cct cagca gcgt ggt gac cgt gccct cc agcagct t gg gcaccagac ct acat ct gc	660
aacgt gaat c acaagcccag caacaccaag gt ggacaaga aagt t gagcc caaat ct t gt	720
gacaaaact c acacat gcc accgt gccca gcacct gaac t cct gggggg accgt cagt c	780
t t cct ct t cc ccccaaaacc caaggacacc ct cat gat ct cccggacccc t gaggt caca	840
t gcgt ggt gg t ggacgt gag ccacgaagac cct gaggt ca agt t caact g gt acgt ggac	900
ggcgt ggagg t gcat aat gc caagacaaag ccgcgggagg agcagt acaa cagcacgt ac	960
cgt gt ggt ca gcgt cct cac cgt cct gcac caggact ggc t gaat ggcaa ggagt acaag	1020
t gcaagg t ct ccaacaaagc cct ccagacc cccat cgaga aaacct ct c caaagccaaa	1080
gggcagcccc gagaaccaca ggt gt acacc ct gccccat cccgggat ga gct gaccaag	1140
aaccaggt ca gcct gacct g cct ggt caaa ggct t ct at c ccagcgacat cgccgt ggag	1200
t gggagagca at gggcagcc ggagaacaac t acaagacca cgcct cccgt gct ggact cc	1260
gacggct cct t ct t cct ct a cagcaagct c accgt ggaca agagcaggt g gcagcagggg	1320
aacgt ct t ct cat gct ccgt gat gcat gag gct ct gcaca accact acac gcagaagagc	1380
ct ct cct gt ct ccgggt aa at ga	1404

<210> 4
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR murina, FR humana en dominio VH
 <400> 4

Met 1 Ala Trp Val 5 Trp Thr Leu Leu Phe 10 Met Ala Ala Ala 15 Gln Ser
Ala Gln Ala 20 Gln Val Gln Leu Val 25 Gln Ser Gly Ala Glu 30 Val Lys Lys
Pro Gly 35 Ala Ser Val Lys Val 40 Oys Lys Ala Ser 45 Gly Tyr Thr Phe
Thr 50 Asn Tyr Gly Met Asn 55 Trp Val Arg Gln Ala 60 Pro Gly Gln Gly Leu
Glu 65 Trp Met Gly Trp 70 Ile Asn Thr Tyr Thr 75 Gly Glu Pro Thr Tyr Ala 80
Asp Ala Phe Lys 85 Gly Arg Val Thr Met 90 Thr Thr Asp Thr Ser 95 Thr Ser
Thr Ala Tyr 100 Met Glu Leu Arg Ser 105 Leu Arg Ser Asp Asp Thr 110 Ala Val
Tyr Tyr 115 Oys Ala Arg Asp Tyr 120 Gly Asp Tyr Gly Met 125 Asp Tyr Trp Gly
Gln Gly 130 Thr Thr Val Thr 135 Ser Ser Ala Ser Thr 140 Lys Gly Pro Ser
Val 145 Phe Pro Leu Ala 150 Pro Ser Ser Lys Ser 155 Thr Ser Gly Gly Thr Ala 160
Ala Leu Gly Oys 165 Leu Val Lys Asp Tyr Phe 170 Pro Glu Pro Val Thr 175 Val
Ser Trp Asn 180 Ser Gly Ala Leu Thr Ser 185 Gly Val His Thr Phe 190 Pro Ala
Val Leu 195 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr 200 Ser Leu Ser Ser Val 205 Val Thr Val
Pro Ser 210 Ser Ser Leu Gly Thr 215 Gln Thr Tyr Ile 220 Oys Asn Val Asn His

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Oys
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Oys Pro Pro Oys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Oys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Oys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Oys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Oys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly Lys
 465

<210> 5
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>

ES 2 523 915 T5

<223> CDR murina, FR humana

<400> 5

```

cagggttcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tccctgcaagg ctctcgttta cacctttacc aactatggaa tgaactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttgagt g gatgggatgg atcaacacct acactggaga gccaacat at      180
gctgatgcct tcaagggcag agtcaccatg accagagaca catccatcag cacagcctac      240
atggagctga gcaggctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagactac      300
ggcgactatg gtatggacta ctgggggtcaa ggaaccaccg tcaccgtctc ctca      354

```

5

<210> 6

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> CDR murina, FR humana

<400> 6

15

```

G n Val  G n Leu Val  G n Ser  G y Ala  G u Val  Lys Lys Pro  G y Ala
 1          5          10          15

Ser Val  Lys Val  Ser Oys Lys Ala Ser  G y Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
          20          25          30

G y Met  Asn Trp Val  Arg G n Ala Pro  G y G n G y Leu G u Trp Met
          35          40          45

G y Trp Ile Asn Thr Tyr Thr  G y G u Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe
          50          55          60

Lys G y Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
          65          70          75          80

Met G u Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Oys
          85          90          95

Ala Arg Asp Tyr G y Asp Tyr G y Met Asp Tyr Trp G y G n G y Thr
          100          105          110

Thr Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 7

<211> 1404

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> CDR murina, FR humana en dominio VH

<400> 7

25

at ggct t ggg t gt ggacct t gct at t cct g at ggagct g cccaaagt gc ccaagcacag 60
gt t cagct gg t gcagt ct gg agct gaggt g aagaagcct g gggcct cagt gaaggt ct cc 120
t gcaaggct t ct ggt t acac ct t t accaac t at ggaat ga act gggg gcg acaggcccct 180
ggacaagggc t t gagi ggat gggat ggat c aacacct aca ct ggagagcc aacat at gct 240
gat gcct t ca agggcagagt caccat gacc agagacacat ccat cagcac agcct acat g 300
gagct gagca ggct gagat c t gacgacag gccgt gt at t act gt gcgag agact acggc 360
gact at ggt a t ggact act g gggc caagga accaccgt ca ccgt ct cct c agct agcacc 420
aaggggcccat cggt ct t ccc cct ggcaccc t cct ccaaga gcacct ct gg gggcacagcg 480
gccct gggct gcct ggt caa ggact act t c cccgaaccgg t gacgggt gt c gt ggaaci ca 540
ggcgccct ga ccagcggcgt gcacacct t c ccgggt gt cc t acagt cct c aggact ct ac 600
t cct cagca gcgt ggt gac cgt gccct cc agcagct t gg gcaccagac ct acat ct gc 660
aacgt gaat c acaagcccag caacaccaag gt ggacaaga aagt t gagcc caaat ct t gt 720
gacaaaact c acacat gccc accgt gccc gcacct gaac t cct gggggg accgt cagt c 780
t t cct ct t cc ccccaaaacc caaggacacc ct cat gat ct cccggacccc t gaggt caca 840
t gcgt ggt gg t ggacgt gag ccacgaagac cct gaggt ca agt t caact g gt acgt ggac 900
ggcgt ggagg t gcat aat gc caagacaaag ccgcgggagg agcagt acaa cagcacgt ac 960
cgt gt ggt ca gcgt cct cac cgt cct gcac caggact ggc t gaat ggcaa ggagt acaag 1020
t gcaaggi ct ccaacaaagc cct cccagcc cccat cgaga aaacct ct c caaagccaaa 1080
gggcagcccc gagaaccaca ggt gt acacc ct gcccctat cccgggat ga gct gaccaag 1140
aaccaggt ca gcct gacct g cct ggt caaa ggct t ct at c ccagcgacat cgccgt ggag 1200
t gggagagca at gggcagcc ggagaacaac t acaagacca cgct cccgt gct ggact cc 1260
gacggct cct t ct t cct ct a cagcaagct c accgt ggaca agagcaggt g gcagcagggg 1320
aacgt ct t ct cat gct ccgt gat gcat gag gct ct gcaca accact acac gcagaagagc 1380
ct ct cct gt ct ccgggt aa at ga 1404

<210> 8

<211> 467

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> CDR murina, FR humana en dominio VH

<400> 8

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Ala Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Oys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

ES 2 523 915 T5

35					40					45					
Thr	Asn 50	Tyr	Gly	Met	Asn	Trp 55	Val	Arg	Gln	Ala	Pro 60	Gly	Gln	Gly	Leu
Glu 65	Trp	Met	Gly	Trp	Ile 70	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly 75	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala 80
Asp	Ala	Phe	Lys	Gly 85	Arg	Val	Thr	Met	Thr 90	Arg	Asp	Thr	Ser	Ile 95	Ser
Thr	Ala	Tyr	Met 100	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu 105	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr 110	Ala	Val
Tyr	Tyr	Oys 115	Ala	Arg	Asp	Tyr	Gly 120	Asp	Tyr	Gly	Met	Asp 125	Tyr	Trp	Gly
Gln	Gly 130	Thr	Thr	Val	Thr	Val 135	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr 140	Lys	Gly	Pro	Ser
Val 145	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro 150	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr 155	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala 160
Ala	Leu	Gly	Oys	Leu 165	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe 170	Pro	Glu	Pro	Val	Thr 175	Val
Ser	Trp	Asn	Ser 180	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser 185	Gly	Val	His	Thr	Phe 190	Pro	Ala
Val	Leu	Gln 195	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr 200	Ser	Leu	Ser	Ser	Val 205	Val	Thr	Val
Pro	Ser 210	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr 215	Gln	Thr	Tyr	Ile	Oys 220	Asn	Val	Asn	His
Lys 225	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys 230	Val	Asp	Lys	Lys	Val 235	Glu	Pro	Lys	Ser	Oys 240
Asp	Lys	Thr	His	Thr 245	Oys	Pro	Pro	Oys	Pro 250	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu 255	Gly
Gly	Pro	Ser	Val 260	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro 265	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr 270	Leu	Met
Ile	Ser	Arg 275	Thr	Pro	Glu	Val	Thr 280	Oys	Val	Val	Val	Asp 285	Val	Ser	His
Glu	Asp 290	Pro	Glu	Val	Lys	Phe 295	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 300	Gly	Val	Glu	Val
His 305	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys 310	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 315	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr 320

Arg Val Val Ser Val₃₂₅ Leu Thr Val Leu His₃₃₀ Gln Asp Trp Leu Asn₃₃₅ Gly
 Lys Glu Tyr Lys₃₄₀ Oys Lys Val Ser Asn₃₄₅ Lys Ala Leu Pro Ala₃₅₀ Pro Ile
 Glu Lys Thr₃₅₅ Ile Ser Lys Ala Lys₃₆₀ Gly Gln Pro Arg Glu₃₆₅ Pro Gln Val
 Tyr Thr₃₇₀ Leu Pro Pro Ser Arg₃₇₅ Asp Glu Leu Thr Lys₃₈₀ Asn Gln Val Ser
 Leu Thr₃₈₅ Oys Leu Val Lys₃₉₀ Gly Phe Tyr Pro Ser₃₉₅ Asp Ile Ala Val Glu₄₀₀
 Trp Glu Ser Asn₄₀₅ Gly Gln Pro Glu Asn₄₁₀ Asn Tyr Lys Thr Thr Pro₄₁₅ Pro
 Val Leu Asp Ser₄₂₀ Asp Gly Ser Phe Phe₄₂₅ Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 Asp Lys Ser₄₃₅ Arg Trp Gln Gln Gly₄₄₀ Asn Val Phe Ser Oys₄₄₅ Ser Val Met
 His Glu₄₅₀ Ala Leu His Asn₄₅₅ His Tyr Thr Gln Lys Ser₄₆₀ Leu Ser Leu Ser
 Pro Gly Lys₄₆₅

<210> 9
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR murina, restos murinos en FR humana
 <400> 9

cagggtcagc tgggtgcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcttgcaagg ctcttggtta cacctttacc aactatggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaacacct acactggaga gccaacat at 180
 gctgatgcct tcaagggcag atttgccttc tctttggaca catccacgag cacagcctac 240
 ttgcagatca acagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagactac 300
 ggcgactatg gtatggacta ctggggtcaa ggaaccaccg tcaccgctct cctca 354

<210> 10
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR murina, restos murinos en FR humana

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Qys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ile Asn Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Qys
85 90 95
Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 11
<211> 1404
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> CDR murina, restos murinos en FR humana
<400> 11

at ggct t ggg t gt ggacct t gct at t cct g at ggcagct g cccaaagt gc ccaagcacag	60
gt t cagct gg t gcagt ct gg agct gaggt g aagaagcct g gggcct cagt gaaggt ct cc	120
t gcaaggct t ct ggt t acac ct t t accaac t at ggaat ga act ggg t gcg acaggccccct	180
ggacaagggc t t gagt ggat gggat ggat c aacacct aca ct ggagagcc aacat at gct	240
gat gcct t ca agggcagat t t gcct t ct ct t t ggacacat ccacgagcac agcct act t g	300
cagat caaca gcct gagat c t gacgacacg gccgt gt at t act gt gcgag agact acggc	360
gact at ggt a t ggact act g ggg t caagga accaccgt ca ccgt ct cct c agct agcacc	420
aagggcccat cgg t ct t ccc cct ggcaccc t cct ccaaga gcacct ct gg gggcacagcg	480
gccct gggct gcct ggt caa ggact act t c cccgaaccgg t gacgg t gt c gt ggaact ca	540
ggcgccct ga ccagcggcgt gcacacct t c ccggct gt cc t acagt cct c aggact ct ac	600
t cct cagca gcgt ggt gac cgt gccct cc agcagct t gg gcaccagac ct acat ct gc	660
aacgt gaat c acaagcccag caacaccaag gt ggacaaga aagt t gagcc caaat ct t gt	720
gacaaaact c acacat gccc accgt gccca gcacct gaac t cct gggggg accgt cagt c	780
t t cct ct t cc ccccaaaacc caaggacacc ct cat gat ct cccggacccc t gaggt caca	840
t gcgt ggt gg t ggacgt gag ccacgaagac cct gaggt ca agt t caact g gt acgt ggac	900
ggcgt ggagg t gcat aat gc caagacaaag ccgcgggagg agcagt acaa cagcacgt ac	960
cgt gt ggt ca gcgt cct cac cgt cct gcac caggact ggc t gaat ggcaa ggagt acaag	1020
t gcaaggt ct ccaacaaagc cct cccagcc cccat cgaga aaacat ct c caaagccaaa	1080
gggcagcccc gagaaccaca ggt gt acacc ct gccccat cccgggat ga gct gaccaag	1140
aaccaggt ca gcct gacct g cct ggt caaa ggct t ct at c ccagcgacat cgccgt ggag	1200
t gggagagca at gggcagcc ggagaacaac t acaagacca cgcct cccgt gct ggact cc	1260
gacggct cct t ct t cct ct a cagcaagct c accgt ggaca agagcaggt g gcagcagggg	1320
aacgt ct t ct cat gct ccgt gat gcat gag gct ct gcaca accact acac gcagaagagc	1380
ct ct cct gt ct ccgggt aa at ga	1404

<210> 12
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR murina, restos murinos en FR humana
 <400> 12

Met 1	Ala	Trp	Val	Trp 5	Thr	Leu	Leu	Phe	Leu 10	Met	Ala	Ala	Ala	Gln 15	Ser
Ala	Gln	Ala	Gln 20	Val	Gln	Leu	Val	Gln 25	Ser	Gly	Ala	Glu	Val 30	Lys	Lys
Pro	Gly	Ala 35	Ser	Val	Lys	Val	Ser 40	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly 45	Tyr	Thr	Phe
Thr	Asn 50	Tyr	Gly	Met	Asn	Trp 55	Val	Arg	Gln	Ala	Pro 60	Gly	Gln	Gly	Leu
Glu 65	Trp	Met	Gly	Trp	Ile 70	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly 75	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala 80
Asp	Ala	Phe	Lys	Gly 85	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser 90	Leu	Asp	Thr	Ser	Thr 95	Ser
Thr	Ala	Tyr	Leu 100	Gln	Ile	Asn	Ser	Leu 105	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr 110	Ala	Val
Tyr	Tyr	Cys 115	Ala	Arg	Asp	Tyr	Gly 120	Asp	Tyr	Gly	Met	Asp 125	Tyr	Trp	Gly
Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser

130					135					140					
Val 145	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro 150	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr 155	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala 160
Ala	Leu	Gly	Oys	Leu 165	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe 170	Pro	Glu	Pro	Val	Thr 175	Val
Ser	Trp	Asn	Ser 180	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser 185	Gly	Val	His	Thr	Phe 190	Pro	Ala
Val	Leu	Gln 195	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr 200	Ser	Leu	Ser	Ser	Val 205	Val	Thr	Val
Pro	Ser 210	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr 215	Gln	Thr	Tyr	Ile	Oys 220	Asn	Val	Asn	His
Lys 225	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys 230	Val	Asp	Lys	Lys	Val 235	Glu	Pro	Lys	Ser	Oys 240
Asp	Lys	Thr	His	Thr 245	Oys	Pro	Pro	Oys	Pro 250	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu 255	Gly
Gly	Pro	Ser	Val 260	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro 265	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr 270	Leu	Met
Ile	Ser	Arg 275	Thr	Pro	Glu	Val	Thr 280	Oys	Val	Val	Val	Asp 285	Val	Ser	His
Glu	Asp 290	Pro	Glu	Val	Lys	Phe 295	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 300	Gly	Val	Glu	Val
His 305	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys 310	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 315	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr 320
Arg	Val	Val	Ser	Val 325	Leu	Thr	Val	Leu	His 330	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 335	Gly
Lys	Glu	Tyr	Lys 340	Oys	Lys	Val	Ser	Asn 345	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala 350	Pro	Ile
Glu	Lys	Thr 355	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 360	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 365	Pro	Gln	Val
Tyr	Thr 370	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 375	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys 380	Asn	Gln	Val	Ser
Leu 385	Thr	Oys	Leu	Val	Lys 390	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 395	Asp	Ile	Ala	Val	Glu 400
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly 405	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn 410	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro 415	Pro

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

5 <210> 13
<211> 354
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> CDR murina, restos murinos en FR humana

<400> 13

cagggt t cāgc t ggt gcagt c t ggagct gag gt gaagaagc ct ggggcct c agt gaaggt c 60
t cct gcaagg ct t ct ggt t a cacct t t acc aact at ggaa t gaact gggt gcgacaggcc 120
cct ggacaag ggct t aagt g gat gggat gg at caacacct aact ggaga gccaacat at 180
gct gat gcct t caagggcag agt caccat g accagagaca cat ccat cag cacagcct ac 240
at ggagct ga gcaggct gag at ct gacgac acggccgt gt at t act gt gc gagagact ac 300
ggcgact at g gt at ggact a ct ggggt caa ggaaccaccg t caccgt ct c ct ca 354

15 <210> 14
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> CDR murina, restos murinos en FR humana

<400> 14

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Oys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Oys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 15
 <211> 1404
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR murina, restos murinos en FR humana

<400> 15

at ggct t ggg t gt ggacct t gct at t cct g at ggcagct g cccaaagt gc ccaagcacag 60
gt t cagct gg t gcagt ct gg agct gaggt g aagaagcct g gggcct cagt gaaggt ct cc 120
t gcaaggct t ct ggt t acac ct t t accaac t at ggaat ga act ggg t gcg acaggccccct 180
ggacaagggc t t aagt gga t gggat gga t c aacacct aca ct ggagagcc aacat at gct 240
gat gcct t ca agggcagagt cacat gacc agagacacat ccat cagcac agcct acat g 300
gagct gagca ggct gagat c t gacgacacg gccgt gt at t act gt gcgag agact acggc 360
gact at ggt a t ggact act g ggg t caagga accaccgt ca ccgt ct cct c agct agcacc 420
aaggggcccat cgggt ct t ccc cct ggcaccc t cct ccaaga gcacct ct gg gggcacagcg 480
gccct gggct gcct ggt caa ggact act t c cccgaaccgg t gacgggt gt c gt ggaact ca 540
ggcgccct ga ccagcggcgt gcacacct t c ccggct gt cc t acagt cct c aggact ct ac 600
t cct cagca gcgt ggt gac cgt gccct cc agcagct t gg gcacccagac ct acat ct gc 660
aacgt gaat c acaagcccag caacaccaag gt ggacaaga aagt t gagcc caaat ct t gt 720
gacaaaact c acacat gcc accgt gccca gcacct gaac t cct gggggg accgt cagt c 780
t t cct ct t cc ccccaaaacc caaggacacc ct cat gat ct cccggacccc t gaggt caca 840
t gcgt ggt gg t ggacgt gag ccacgaagac cct gaggt ca agt t caact g gt acgt ggac 900
ggcgt ggagg t gcat aat gc caagacaaag ccgcgggagg agcagt acaa cagcacgt ac 960
cgt gt ggt ca gcgt cct cac cgt cct gcac caggact ggc t gaat ggcaa ggagt acaag 1020
t gcaagggt ct ccaacaaagc cct cccagcc cccat cgaga aaacct ct c caaagccaaa 1080
gggcagcccc gagaaccaca ggt gt acacc ct gcccccat cccgggat ga gct gaccaag 1140
aaccagggt ca gcct gacct g cct ggt caaa ggct t ct at c ccagcgacat cgccgt ggag 1200
t gggagagca at gggcagcc ggagaacaac t acaagacca cgcct cccgt gct ggact cc 1260
gacggct cct t ct t cct ct a cagcaagct c accgt ggaca agagcaggt g gcagcagggg 1320
aacgt ct t ct cat gct ccgt gat gcat gag gct ct gcaca accact acac gcagaagagc 1380
ct ct cct gt ct ccgggt aa at ga 1404

<210> 16
<211> 467
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR murina, restos murinos en FR humana
<400> 16

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15
 Ala Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ala Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

225				230				235				240			
Asp	Lys	Thr	His	Thr 245	Oys	Pro	Pro	Oys	Pro 250	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu 255	Gly
Gly	Pro	Ser	Val 260	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro 265	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr 270	Leu	Met
Ile	Ser	Arg 275	Thr	Pro	Glu	Val	Thr 280	Oys	Val	Val	Val	Asp 285	Val	Ser	His
Glu	Asp 290	Pro	Glu	Val	Lys	Phe 295	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp 300	Gly	Val	Glu	Val
His 305	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys 310	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln 315	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr 320
Arg	Val	Val	Ser	Val 325	Leu	Thr	Val	Leu	His 330	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn 335	Gly
Lys	Glu	Tyr	Lys 340	Oys	Lys	Val	Ser	Asn 345	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala 350	Pro	Ile
Glu	Lys	Thr 355	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys 360	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu 365	Pro	Gln	Val
Tyr	Thr 370	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg 375	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys 380	Asn	Gln	Val	Ser
Leu 385	Thr	Oys	Leu	Val	Lys 390	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser 395	Asp	Ile	Ala	Val	Glu 400
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly 405	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn 410	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro 415	Pro
Val	Leu	Asp	Ser 420	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe 425	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu 430	Thr	Val
Asp	Lys	Ser 435	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly 440	Asn	Val	Phe	Ser	Oys 445	Ser	Val	Met
His	Glu 450	Ala	Leu	His	Asn	His 455	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser 460	Leu	Ser	Leu	Ser
Pro 465	Gly	Lys													

<210> 17
<211> 354
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> CDR murina, restos murinos en FR humana

<400> 17

```

cagggttcagc tggtagcagtc tggagctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc      60
tccitgcaagg ctctcggta cacctttacc aactatggaa tgaactgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcttaagtg gatgggatgg atcaacacct acactggaga gccaacatat      180
gctgatgcct tcaagggcag atttgccttc tctttggaca catccacgag cacagcctac      240
atggagctga ggagcctgag atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagagactac      300
ggcgactatg gtatggacta ctggggicaa ggaaccaccg tcaccgtctc ctca      354

```

5 <210> 18
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial I

10 <220>
 <223> CDR murina, restos murinos en FR humana

<400> 18

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1          5          10
Ser Val Lys Val Ser Oys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20          25
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met
 35          40          45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Ala Phe
 50          55          60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65          70          75
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Oys
 85          90
Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100          105          110
Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

```

15 <210> 19
 <211> 1404
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CDR murina, restos murinos en FR humana

25 <400> 19

at ggct t ggg t gt ggacct t gct att cct g at ggcagct g cccaaagt gc ccaagcacag 60

gt t cagct gg t gcagt ct gg agct gaggt g aagaagcct g gggcct cagt gaaggt ct cc 120

t gcaaggct t ct ggt t acac ct t t accaac t at ggaat ga act gggg gcg acagggccct 180

ggacaagggc t t aagt ggat gggat ggat c aacacct aca ct ggagagcc aacat at gct 240

gat gcc t ca agggcagat t t gcc t ct ct t t ggacacat ccacgagcac agcct acat g 300

gagct gagga gcct gagat c t gacgacacg gccgt gt at t act gt gcgag agact acggc 360

gact at ggt a t ggact act g ggg caagga accaccgt ca ccgt ct cct c agct agcacc 420

aagggcccat cgggt ct t ccc cct ggcaccc t cct ccaaga gcacct ct gg gggcacagcg 480

gccct gggct gcct ggt caa ggact act t c cccgaaccgg t gacgggt gt c gt ggaact ca 540

ggcgccct ga ccagcggcgt gcacacct t c ccgggt gt cc t acagt cct c aggact ct ac 600

t cct cagca gcgt ggt gac cgt gccct cc agcagct t gg gcacccagac ct acat ct gc 660

aacgt gaat c acaagcccag caacaccaag gt ggacaaga aagt t gagcc caaat ct t gt 720

gacaaaact c acacat gccc accgt gccca gcacct gaac t cct gggggg accgt cagt c 780

t t cct ct t ccc ccccaaaacc caaggacacc ct cat gat ct cccggacccc t gaggt caca 840

t gcgt ggt gg t ggacgt gag ccacgaagac cct gaggt ca agt t caact g gt acgt ggac 900

ggcgt ggagg t gcat aat gc caagacaaag ccgcgggagg agcagt acaa cagcacgt ac 960

cgt gt ggt ca gcgt cct cac cgt cct gcac caggact ggc t gaat ggcaa ggagt acaag 1020

t gcaaggt ct ccaacaaagc cct cccagcc cccat cgaga aaacct ct c caaagccaaa 1080

gggcagcccc gagaaccaca ggt gt acacc ct gcccccat cccgggat ga gct gaccaag 1140

aaccaggt ca gcct gacct g cct ggt caaa ggct t ct at c ccagcgacat cgccgt ggag 1200

t gggagagca at gggcagcc ggagaacaac t acaagacca cgcct cccgt gct ggact cc 1260

gacggct cct t ct t cct ct a cagcaagct c accgt ggaca agagcaggt g gcagcagggg 1320

aacgt ct t ct cat gct ccgt gat gcat gag gct ct gcaca accact acac gcagaagagc 1380

ct ct ccct gt ct ccgggt aa at ga 1404

<210> 20
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR murina, restos murinos en FR humana

<400> 20

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Ala Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Oys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ala Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

ES 2 523 915 T5

[illegible]

<210> 21
<211> 396
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 21

at ggagacag	acacact cct	gt l at gggl a	ct gct gct ct	gggt t ccagg	t t ccact ggt	60
gacat t gt gc	t gacacagt c	t cct gct t cc	t t agct gl at	ct ct ggggca	gagggccacc	120
at ci cat gca	gggccagcaa	aagt gt cagl	acai ci ggct	at agt t t t at	gcact ggt at	180
caacagaaac	caggacagcc	acccaaact c	ct cat ci ai c	t t gcat ccaa	cct agaai ci	240
ggggt cct g	ccagg t cag	t ggcagt ggg	t ci gggacag	act t caccct	caacat ccat	300
ccl gt ggagg	aggaggat gc	t gcaacct ai	t act gt cagc	acagt aggga	ggt t ccgt gg	360
acgt t cggt g	gaggcaccaa	gct ggaaat c	aaacgg			396

<210> 22
<211> 132
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 22

ES 2 523 915 T5

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30
 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Oys Arg Ala Ser Lys Ser
 35 40 45
 Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Gln His Ser Arg Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg
 130

<210> 23
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR murina, FR humana

<400> 23

gacat cgt ga t gaccacgt c t ccagact cc ct ggct gt gt ct ct gggcga gagggccacc 60
 at caact gca gggccagcaa aagt gt cagt acat ct ggct at agt t t t at gcact ggt ac 120
 cagcagaaac caggacagcc t cct aagct g ct cat t t acc t t gcat ccaa cct aga at cc 180
 ggggt ccct g accgat t cag t ggcagcggg t ct gggacag at t t cact ct caccat cagc 240
 agcct gcagg ct gaagat gt ggcagt t t at t act gt cagc acagt aggga ggt t ccgt gg 300
 acgt t cgg t c agggcaccaa ggt ggaaat c aaacgt 336

<210> 24
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> CDR murina, FR humana

<400> 24

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Oys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Oys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 25
<211> 717
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> CDR murina, FR humana

<400> 25

atggagacag acacactcct gttatgggt a ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gacatcgtga t gaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 120
atcaactgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttttat gcactggtac 180
cagcagaaac caggacagcc t cct aagctg ctcat t t acc ttgcat ccaa cct agaat cc 240
ggggtccctg accgat t cag tggcagcggg tctgggacag attt cactct caccatcagc 300
agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtttat t actgtcagc acagt agggg ggt t ccgtgg 360
acgt t cgggt c agggcaccaa ggtggaaat c aaacgt acgg tggctgcacc atctgtcttc 420
atcttccgc catctgalga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480
aat aact t ct atccagaga ggccaaagt a cagt ggaagg tggat aacgc cctccaatcg 540
ggt aact ccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcacct a cagcctcagc 600
agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagt c 660
acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagct t ca acaggggaga gtgttag 717

<210> 26
<211> 238
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR murina, FR humana

<400> 26

Met 1 Gl u Thr Asp 5 Thr Leu Leu Leu Trp Val 10 Leu Leu Leu Trp Val 15 Pro
Gly Ser Thr Gly 20 Asp Ile Val Met 25 Gln Ser Pro Asp 30 Ser Leu Ala
Val Ser 35 Leu Gly Gl u Arg Ala Thr 40 Ile Asn Oys Arg 45 Ala Ser Lys Ser
Val Ser 50 Thr Ser Gly Tyr Ser 55 Phe Met His Trp Tyr 60 Gln Gln Lys Pro
Gly 65 Gln Pro Pro Lys 70 Leu Leu Ile Tyr Leu 75 Ala Ser Asn Leu Gl u Ser 80
Gly Val Pro Asp 85 Arg Phe Ser Gly Ser 90 Gly Ser Gly Thr Asp Phe 95 Thr
Leu Thr Ile Ser 100 Ser Leu Gln Ala Gl u 105 Asp Val Ala Val Tyr 110 Tyr Oys
Gln His Ser 115 Arg Gl u Val Pro Trp 120 Thr Phe Gly Gln Gly 125 Thr Lys Val
Gl u Ile Lys Arg Thr Val 135 Ala Ala Pro Ser Val 140 Phe Ile Phe Pro Pro
Ser 145 Asp Gl u Gln Leu Lys 150 Ser Gly Thr Ala Ser 155 Val Val Oys Leu Leu 160
Asn Asn Phe Tyr 165 Pro Arg Gl u Ala Lys Val 170 Gln Trp Lys Val Asp 175 Asn
Ala Leu Gln Ser 180 Gly Asn Ser Gln Gl u 185 Ser Val Thr Gl u Gln 190 Asp Ser
Lys Asp Ser 195 Thr Tyr Ser Leu Ser 200 Ser Thr Leu Thr 205 Ser Lys Ala
Asp Tyr 210 Gl u Lys His Lys Val 215 Tyr Ala Oys Gl u Val 220 Thr His Gln Gly
Leu 225 Ser Ser Pro Val Thr 230 Lys Ser Phe Asn Arg 235 Gly Gl u Oys

5 <210> 27
<211> 411
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

10 <400> 27

ES 2 523 915 T5

at ggaat gga cct ggg t c t t t c t c t c c t c c t g c c a g t a a c t g c a g a t g t c c a a t c c c a g 60
 g t t c a g c t g c a a c a g t c t g g a a c t g a g c t g a t g a c g c c t g g g c c t c a g t g a c g a t g t c c 120
 t g c a a g a c t t c t g g c t a c a c a t t c a g t a c c t a c t g g a t a g a g t g g g t a a a a c a g a g g c c t 180
 g g a c a t g g c c t t g a g t g g a t t g g a g a a a t t t t a c c t g g a a g t g g t t a t a c t g a c t a c a a t 240
 g a g a a g t t c a a g g c c a a g g c c a c a t t c a c t g c a g a t a c a t c c t c c a a c a c a g c c t a c a t g 300
 c a a c t c a g c a g c c t g g c a t c t g a g g a c t c t g c c g t c t a t t a c t g t g c a a g a t g g g a t a g g 360
 c t c t a t g c t a t g g a c t a c t g g g g t c a a g g a a c c t c a g t c a c c g t c t c c t c a 411

<210> 28
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 28

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Asp
 1 5 10 15
 Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Glu Leu Met Thr
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Thr Met Ser Oys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Ser Thr Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Gly Pro Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Ala Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Oys Ala Arg Trp Asp Arg Leu Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 29
 <211> 396
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 29

ES 2 523 915 T5

```

at ggagacag acacact cct gt tat gggta ct gct gct ct ggg tccagg t tccact ggt      60
gacat tgt gc t gacacagt c t cct gct tcc t t aact gt at ct ct ggggca gaagaccacc      120
at ct cat gca gggccagcaa gagt gt cagt acat ct ggct at agt t t t at g cact ggt ac      180
caact gaaac caggacagt c acccaaact c ct cat ct at c t t gcgt ccaa cct accat ct      240

gggg tccct g ccagg t cag t ggcagt ggg t ct gggacag act t caccct caaaat ccat      300
cct gt ggagg aggaggat gc t gcaacct at t act gt cagc acagt agggga gat t ccgt ac      360
acgt t cggag gggggaccaa gct ggaaat a acacgg      396

```

<210> 30
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 30

```

Met  Glu Thr  Asp Thr  Leu Leu Leu Trp Val  Leu Leu Leu Trp Val  Pro
 1          5          10          15

Gly Ser Thr  Gly Asp Ile Val  Leu Thr  Gln Ser  Pro Ala Ser  Leu Thr
20          25          30

Val Ser  Leu Gly Gln Lys Thr  Thr  Ile Ser  Oys Arg  Ala Ser  Lys Ser
35          40          45

Val Ser  Thr Ser  Gly Tyr Ser  Phe Met His Trp Tyr  Gln Leu Lys Pro
50          55          60

Gly Gln Ser  Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  Leu Ala Ser  Asp Leu Pro Ser
65          70          75

Gly Val  Pro Ala Arg Phe Ser  Gly Ser  Gly Ser  Gly Thr Asp Phe Thr
85          90          95

Leu Lys Ile His Pro Val  Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr  Tyr Tyr Oys
100          105          110

Gln His Ser  Arg Glu Ile Pro Tyr Thr  Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115          120          125

Glu Ile Thr Arg
130

```

<210> 31
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> *Humana*

<400> 31

ES 2 523 915 T5

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75
 Tyr Ile Oys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Oys Asp Lys Thr His Thr Oys Pro Pro Oys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Oys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Oys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Oys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Oys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

330

<210> 32
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Humana

5

<400> 32

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

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Oys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Oys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Oys Oys Val Glu Oys Pro Pro Oys Pro Ala Pro
 100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125

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

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Oys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

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

Gln Val Ser Leu Thr 245 Oys Leu Val Lys Gly 250 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile 255
 Ala Val Glu Trp 260 Glu Ser Asn Gly 265 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr 270 Lys Thr
 Thr Pro Pro 275 Met Leu Asp Ser Asp 280 Gly Ser Phe Phe Leu 285 Tyr Ser Lys
 Leu Thr 290 Val Asp Lys Ser Arg 295 Trp Gln Gln Gly Asn 300 Val Phe Ser Oys
 Ser 305 Val Met His Glu 310 Ala Leu His Asn His Tyr 315 Thr Gln Lys Ser Leu 320
 Ser Leu Ser Pro Gly 325 Lys

<210> 33
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> Humana

<400> 33

Gln Met Gln Gly Val 5 Asn Oys Thr Val Ser 10 Ser Glu Leu Lys Thr 15 Pro
 Leu Gly Asp Thr 20 Thr His Thr Oys 25 Arg Oys Pro Glu 30 Lys Ser
 Oys Asp Thr 35 Pro Pro Pro Oys 40 Arg Oys Pro Glu 45 Lys Ser Oys
 Asp Thr 50 Pro Pro Pro Oys 55 Arg Oys Pro Glu 60 Lys Ser Oys Asp
 Thr 65 Pro Pro Pro Oys 70 Arg Oys Pro Ala 75 Glu Leu Leu Gly 80
 Pro Ser Val Phe 85 Leu Phe Pro Pro Lys 90 Lys Asp Thr Leu Met 95 Ile
 Ser Arg Thr Pro 100 Glu Val Thr Oys 105 Val Val Asp Val Ser 110 His Glu
 Asp Pro Glu 115 Val Gln Phe Lys Trp 120 Tyr Val Asp Gly Val 125 Gln Val His
 Asn Ala 130 Lys Thr Lys Pro Arg 135 Glu Gln Gln Phe Asn 140 Ser Thr Phe Arg
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asn Trp Leu Asp Gly Lys

145		150		155		160									
G u	Tyr	Lys	Oys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	G u
				165					170					175	
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	G u	Pro	Gln	Val	Tyr
			180					185					190		
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	G u	G u	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
		195					200					205			
Thr	Oys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	G u	Trp
	210					215					220				
G u	Ser	Ser	Gly	Gln	Pro	G u	Asn	Asn	Tyr	Asn	Thr	Thr	Pro	Pro	Met
225					230					235					240
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
				245					250					255	
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Ile	Phe	Ser	Oys	Ser	Val	Met	His
			260					265					270		
G u	Ala	Leu	His	Asn	Arg	Phe	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
		275					280					285			
Gly	Lys														
	290														

<210> 34
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Humana
 <400> 34

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

Arg Val Glu Ser₁₀₀ Lys Tyr Gly Pro Pro₁₀₅ Oys Pro Ser Oys Pro₁₁₀ Ala Pro
 Glu Phe Leu₁₁₅ Gly Gly Pro Ser Val₁₂₀ Phe Leu Phe Pro Pro₁₂₅ Lys Pro Lys
 Asp Thr₁₃₀ Leu Met Ile Ser Arg₁₃₅ Thr Pro Glu Val Thr₁₄₀ Oys Val Val Val
 Asp₁₄₅ Val Ser Gln Glu Asp₁₅₀ Pro Glu Val Gln Phe₁₅₅ Asn Trp Tyr Val Asp₁₆₀
 Gly Val Glu Val His₁₆₅ Asn Ala Lys Thr Lys₁₇₀ Pro Arg Glu Glu Gln₁₇₅ Phe
 Asn Ser Thr Tyr₁₈₀ Arg Val Val Ser Val₁₈₅ Leu Thr Val Leu His₁₉₀ Gln Asp
 Trp Leu Asn₁₉₅ Gly Lys Glu Tyr Lys₂₀₀ Oys Lys Val Ser Asn₂₀₅ Lys Gly Leu
 Pro Ser₂₁₀ Ser Ile Glu Lys Thr₂₁₅ Ile Ser Lys Ala Lys₂₂₀ Gly Gln Pro Arg
 Glu₂₂₅ Pro Gln Val Tyr Thr₂₃₀ Leu Pro Pro Ser Gln₂₃₅ Glu Glu Met Thr Lys₂₄₀
 Asn Gln Val Ser Leu₂₄₅ Thr Oys Leu Val Lys₂₅₀ Gly Phe Tyr Pro Ser₂₅₅ Asp
 Ile Ala Val Glu₂₆₀ Trp Glu Ser Asn Gly₂₆₅ Gln Pro Glu Asn Asn₂₇₀ Tyr Lys
 Thr Thr Pro₂₇₅ Pro Val Leu Asp Ser₂₈₀ Asp Gly Ser Phe Phe₂₈₅ Leu Tyr Ser
 Arg Leu₂₉₀ Thr Val Asp Lys Ser₂₉₅ Arg Trp Gln Glu Gly₃₀₀ Asn Val Phe Ser
 Oys₃₀₅ Ser Val Met His Glu₃₁₀ Ala Leu His Asn His₃₁₅ Tyr Thr Gln Lys Ser₃₂₀
 Leu Ser Leu Ser Leu₃₂₅ Gly Lys

<210> 35
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Anticuerpo humanizado

<400> 35

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15
 Ala Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ala Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

I l e Ser Arg Thr Pro Gl u Val Thr Oys Val Val Val Asp Val Ser H i s
275 280 285

Gl u Asp Pro Gl u Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Gl u Val
290 295 300

H i s Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Gl u Gl u Gl n Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu H i s Gl n Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Gl u Tyr Lys Oys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro I l e
340 345 350

Gl u Lys Thr I l e Ser Lys Ala Lys Gly Gl n Pro Arg Gl u Pro Gl n Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Gl u Leu Thr Lys Asn Gl n Val Ser
370 375 380

Leu Thr Oys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp I l e Ala Val Gl u
385 390 395 400

Trp Gl u Ser Asn Gly Gl n Pro Gl u Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gl n Gl n Gly Asn Val Phe Ser Oys Ser Val Met
435 440 445

H i s Gl u Ala Leu H i s Asn H i s Tyr Thr Gl n Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 36
<211> 463
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo humanizado

<400> 36

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gl n Ser
1 5 10 15

Ala Gl n Ala Gl n Val Gl n Leu Val Gl n Ser Gly Ala Gl u Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Oys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg G n Ala Pro Gly G n Gly Leu
 50 55 60
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ala Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105
 Tyr Tyr Oys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 G n Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Oys Ser Arg Ser Thr Ser Ser Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Oys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Gu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu G n Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr G n Thr Tyr Thr Oys Asn Val Asp His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Gu Arg Lys Oys Oys
 225 230 235 240
 Val Gu Oys Pro Pro Oys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
 245 250 255
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 260 265 270
 Pro Gu Val Thr Oys Val Val Val Asp Val Ser His Gu Asp Pro Gu
 275 280 285
 Val G n Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Gu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
305 310 315 320

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
325 330 335

Oys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
340 345 350

Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
355 360 365

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Oys Leu
370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Oys Ser Val Met His Glu Ala Leu
435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 37
<211> 464
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo humanizado

<400> 37

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Ala Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Oys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ala Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 225 230 235 240
 Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 245 250 255
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 275 280 285
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 325 330 335
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Oys
 370 375 380
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430
 Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Oys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450 455 460

<210> 38
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Anticuerpo humanizado

<400> 38

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15
 Ala Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Oys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ala Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Oys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Gly Oys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Gu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Oys Asn Val Asn His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Gu Pro Lys Ser Oys
 225 230 235 240
 Asp Lys Thr His Thr Oys Pro Pro Oys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Gu Val Thr Oys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 Gu Asp Pro Gu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Gu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Gu Gu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Gu Tyr Lys Oys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 Gu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Gu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Gu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Oys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Gu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Oys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 39
<211> 464
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Anticuerpo humanizado

<400> 39

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Ala Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Oys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ala Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Oys Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Oys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Oys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Oys Asn Val Asp His
 210 215 220
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 225 230 235 240
 Pro Pro Oys Pro Pro Oys Pro Ala Pro Glu Phe Ala Gly Ala Pro Ser
 245 250 255
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270
 Thr Pro Glu Val Thr Oys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 275 280 285
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Ala Tyr
 325 330 335
 Lys Oys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 340 345 350
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Oys
 370 375 380
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

ES 2 523 915 T5

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Oys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450 455 460

REIVINDICACIONES

1. Un agente de unión a la diana variante que comprende:

- 5 una región de unión que comprende una región Fv de anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno diana;
una región Fc de una región constante de inmunoglobulina IgG1 humana, comprendiendo la región Fc al menos una sustitución de un resto de aminoácido que participa en la interacción de unión del receptor Fc γ IIIA con la
10 región Fc; donde al menos una sustitución comprende la introducción de un resto de cisteína en la posición de aminoácido 239 de la región Fc, es decir S239C de acuerdo con el índice EU expuesto en Kabat; y
un agente terapéutico que ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador conjugado directa o indirectamente con el resto de cisteína introducido;

- 15 donde el agente de unión a la diana variante ejerce un efecto citotóxico, citostático o inmunomodulador sobre una célula que expresa antígeno diana; y
donde el agente de unión a la diana variante presenta una reducción de la unión con un receptor Fc γ IIIA.

2. El agente de unión a la diana variante de la reivindicación 1, donde el agente terapéutico es un agente citotóxico.

- 20 3. El agente de unión a la diana variante de la reivindicación 1 o 2, donde el agente terapéutico es una auristatina, un agente de unión al surco menor del ADN, un agente alquilante del surco menor del ADN, una enediína, una lexitropsina, una duocarmicina, un taxano, una puromicina, una dolastatina, un maitansinoide o un alcaloide de la vinca.

- 25 4. El agente de unión a la diana variante de la reivindicación 1 o 2, donde el agente terapéutico es un agente antitubulina.

5. El agente de unión a la diana variante de la reivindicación 4, donde el agente antitubulina es una auristatina.

- 30 6. El agente de unión a la diana variante de la reivindicación 5, donde la auristatina es MMAF.

7. El agente de unión a la diana variante de la reivindicación 5, donde la auristatina es MMAE.

- 35 8. El agente de unión a la diana variante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la región de unión se une específicamente a CD20, CD30, CD33 o CD70.

9. El agente de unión a la diana variante de la reivindicación 8, donde la región de unión se une específicamente a CD33.

- 40 10. El agente de unión a la diana variante de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el agente de unión a la diana variante es un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico.

- 45 11. El agente de unión a la diana variante de la reivindicación 1, donde el agente terapéutico es un fármaco citotóxico, y donde el fármaco citotóxico está conjugado al residuo de cisteína introducido en forma de un fármaco citotóxico derivado de maleimida.

- 50 12. Un agente de unión a la diana variante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto, donde el agente terapéutico es un agente citotóxico y donde la región de unión del agente de unión a la diana variante comprende una región Fv de anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno diana expresado por células cancerosas.

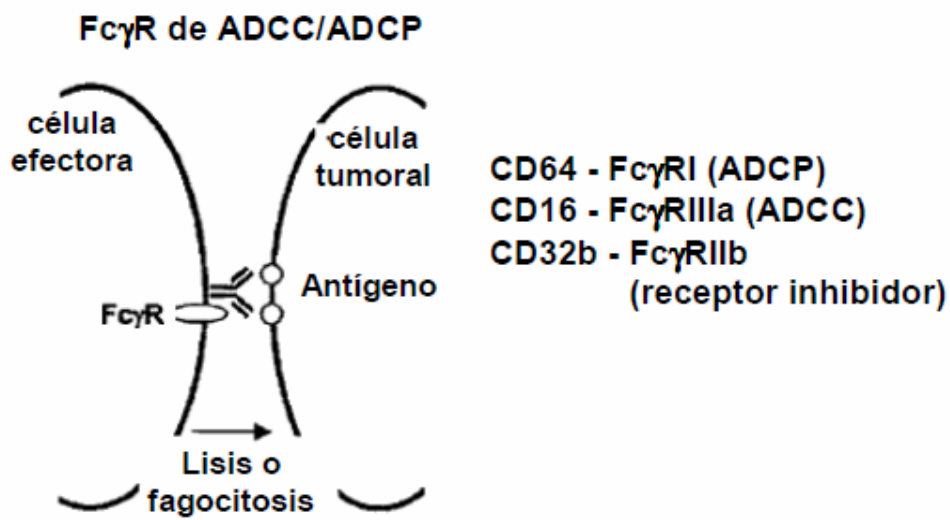
- 55 13. El agente de unión a la diana variante de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde el cáncer es un tumor de riñón, un linfoma de células B, un carcinoma de colon, enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de no Hodgkin, un linfoma de células del manto, leucemia linfocítica crónica, leucemia linfocítica aguda, un carcinoma nasofaríngeo, tumor cerebral o un carcinoma tímico.

- 60 14. Un agente de unión a la diana variante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 10 u 11, para su uso en el tratamiento de leucemia mielocítica aguda en un sujeto, donde el agente terapéutico es un agente citotóxico y donde la región de unión del agente de unión a la diana variante comprende una región Fv de anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un antígeno diana expresado por células cancerosas.

- 65 15. Una composición farmacéutica que comprende un agente de unión a la diana variante de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y al menos un ingrediente farmacéuticamente compatible.

Figura 1

Funciones de los receptores Fc



Fc γ RI, II y III se expresan en una variedad de tejidos normales, leucocitos, todas las células de origen mieloide, células endoteliales y algunas células epiteliales.

Figura 2

Secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4

A. IgG1

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

B. IgG2

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKIVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAP
IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSD
GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

C. IgG3

QMQQVNCIVSSELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCP
RCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVQVHNAKTKPREQQFN
STFRVSVLTVLHQNWLDGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMEALHNHFT
QKSLSLSPGK

D. IgG4

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 3

Secuencias de aminoácidos de las variantes de los isotipos IgG1, IgG2 e IgG4 de h1F6

A. IgG1 de h1F6

MAWVWTLFLMAAAQSAQAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWI
NTYTGNPTYADAFKGRVTMTDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDYGDYGMIDYWGQGTTVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

B. IgG2 de h1F6

MAWVWTLFLMAAAQSAQAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWI
NTYTGNPTYADAFKGRVTMTDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDYGDYGMIDYWGQGTTVTVSSAST
KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SNFGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
DVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

B. IgG4 de h1F6

MAWVWTLFLMAAAQSAQAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWI
NTYTGNPTYADAFKGRVTMTDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDYGDYGMIDYWGQGTTVTVSSAST
KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 4

Secuencias de aminoácidos de las variantes de los dominios Fc IgG1v1 e IgG4v3 de h1F6

A. IgG1v1 de h1F6

MAWVWTLLEFLMAAAQSAQAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWI
NTYTGNPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGT TTVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPVAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

B. IgG4v3 de h1F6

MAWVWTLLEFLMAAAQSAQAQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWI
NTYTGNPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRRLSDDTAVYYCARDYGDYGM DYWGQGT TTVTVSSAST
KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPEFAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKAYKCKVSNKGLPSSIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 5

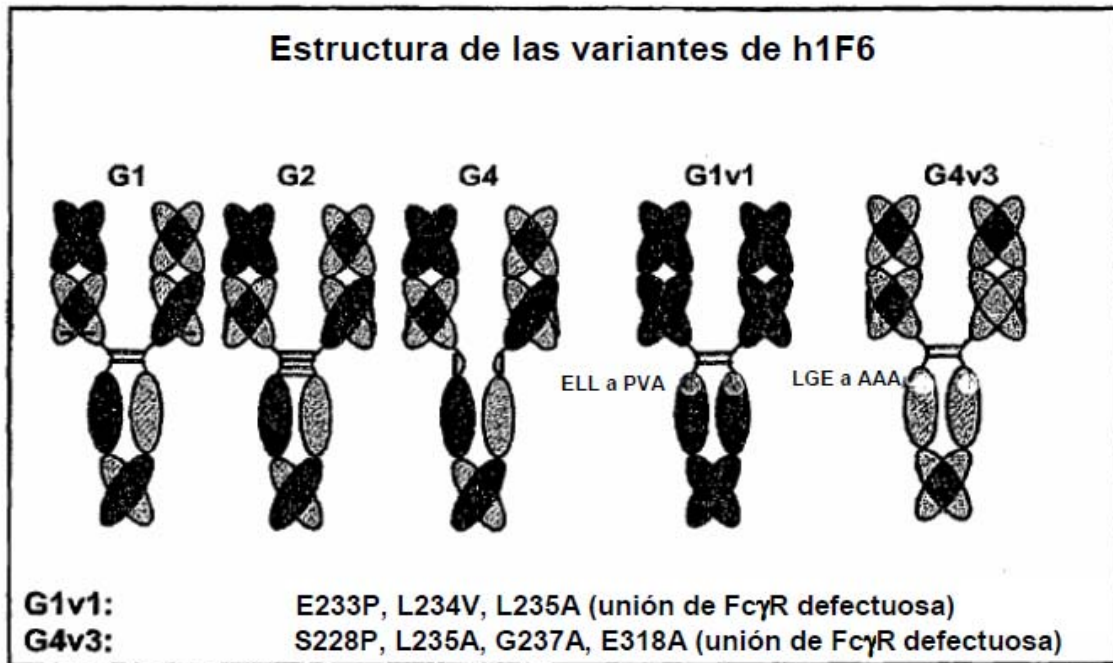
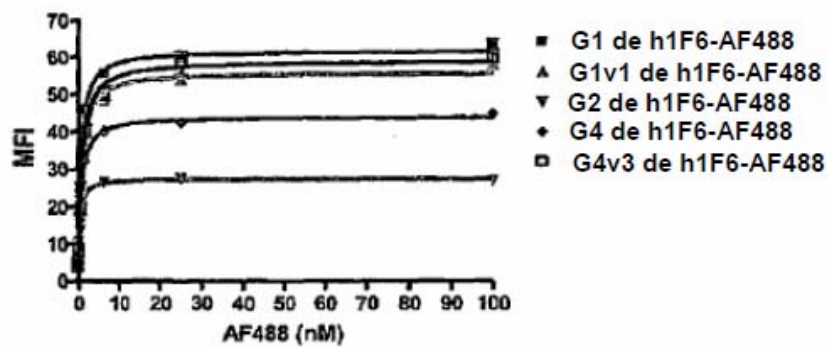


Figura 6

Afinidad de unión de las variantes de h1F6

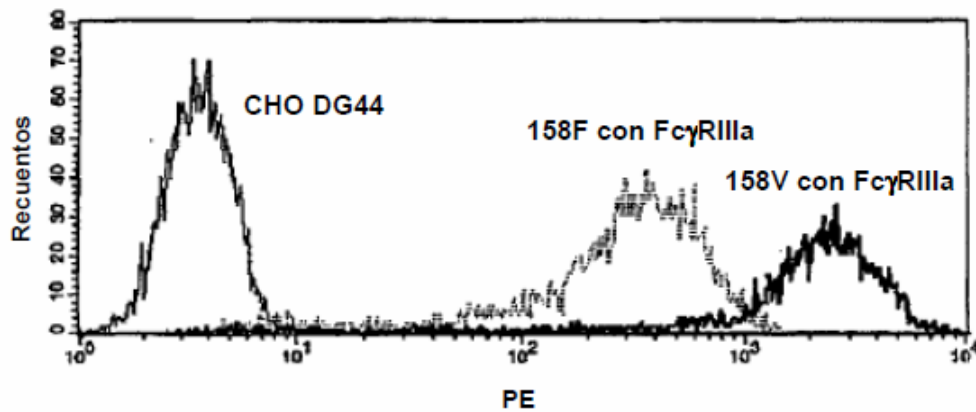
786-O (190.000 receptores/célula)



	AF488/Ac	K _D media	D.E
G1 de h1F6	3.4	1.27	0.12
G1v1 de h1F6	3.6	1.13	0.25
G2 de h1F6	4.4	0.95	0.31
G4 de h1F6	4.2	1.14	0.34
G4v3 de h1F6	4.3	1.30	0.08

Figura 7

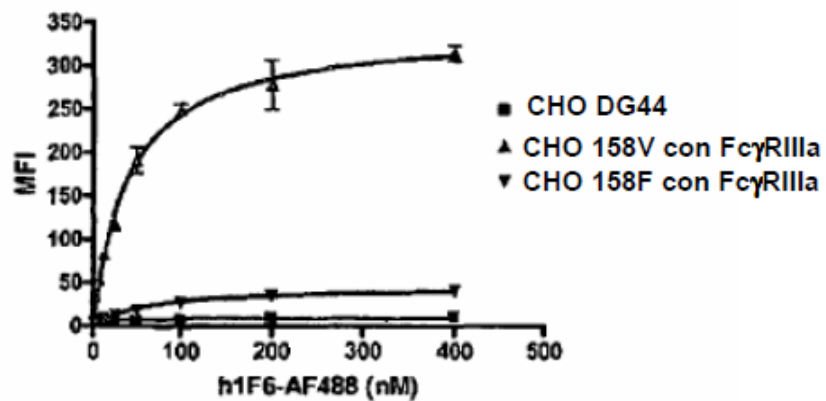
Líneas celulares CHO con FcγRIIIa



Análisis de FACS de líneas celulares que expresan FcγRIIIa usando FcγRIIIa-PE anti-humano

Figura 8

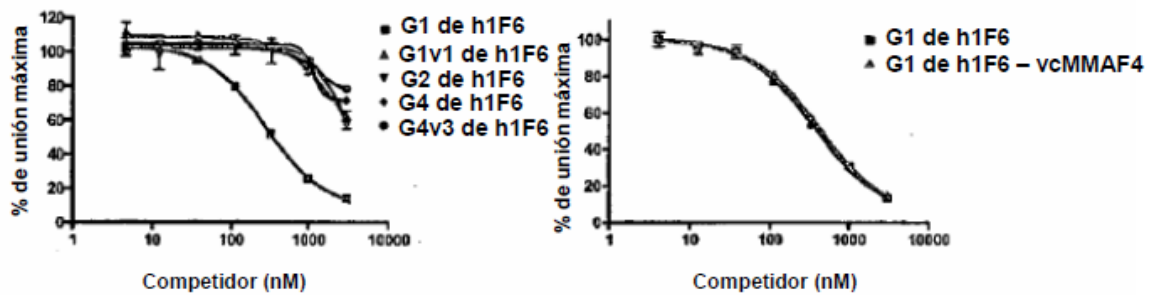
Unión de saturación de CHO con FcγRIIIa



Ensayo de unión de saturación usando h1F6 marcado con AF488 leída en el LSRII

Figura 9

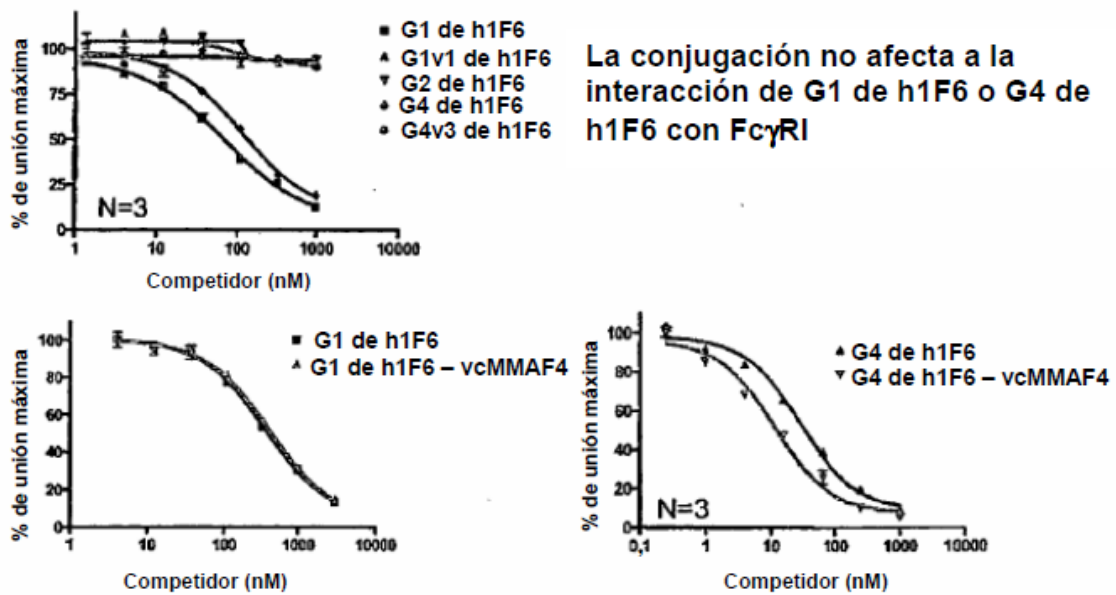
Interacciones de FcγRIIIa (158V)



La conjugación no afecta a las interacciones de G1 de h1F6 con FcγRIIIa

Figura 10

Interacciones de FcγRIIIa



La conjugación no afecta a la interacción de G1 de h1F6 o G4 de h1F6 con FcγRI

Figura 11

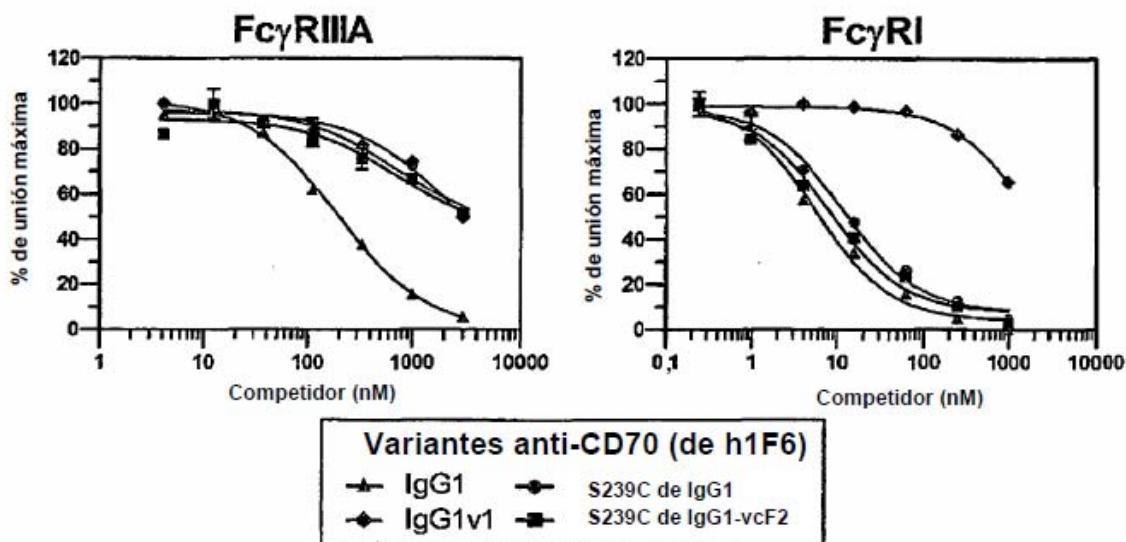


Figura 12

Actividad *in vivo* de los ADC de variantes de h1F6

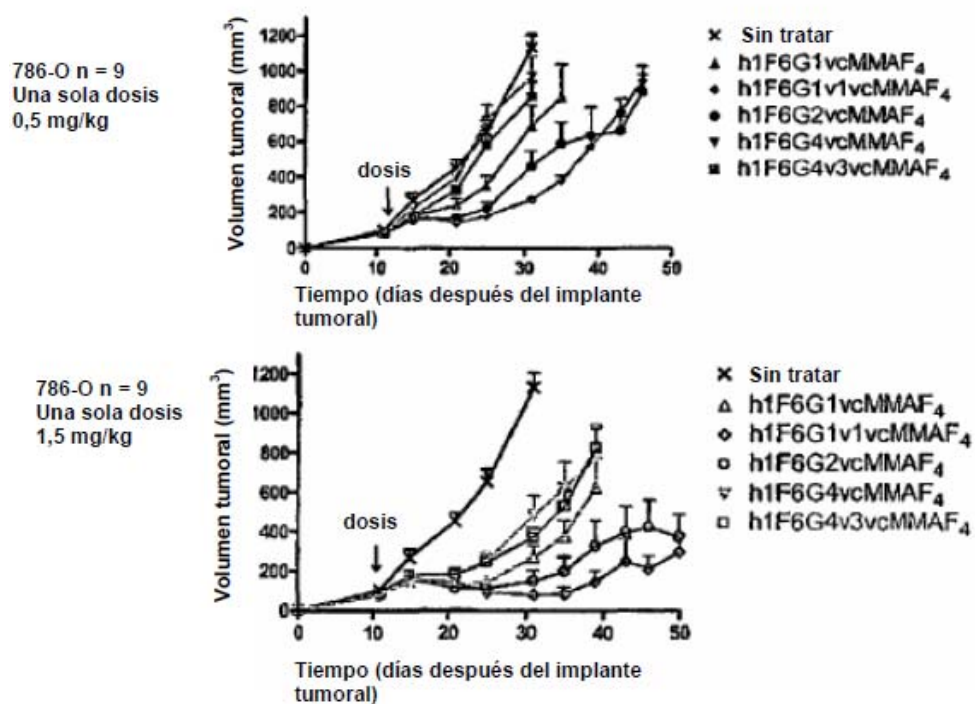


Figura 13

Eficacia *in vivo* de los ADC de variantes de h1F6

Eficacia de los ADC de variantes de h1F6 en ratones desnudos que portan tumores subcutáneos de 786-O

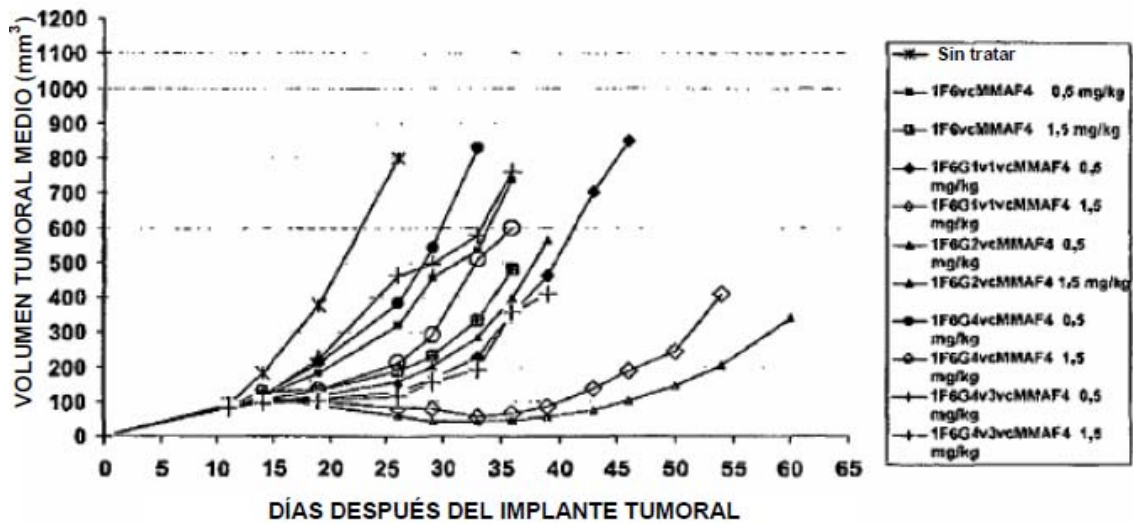


Figura 14

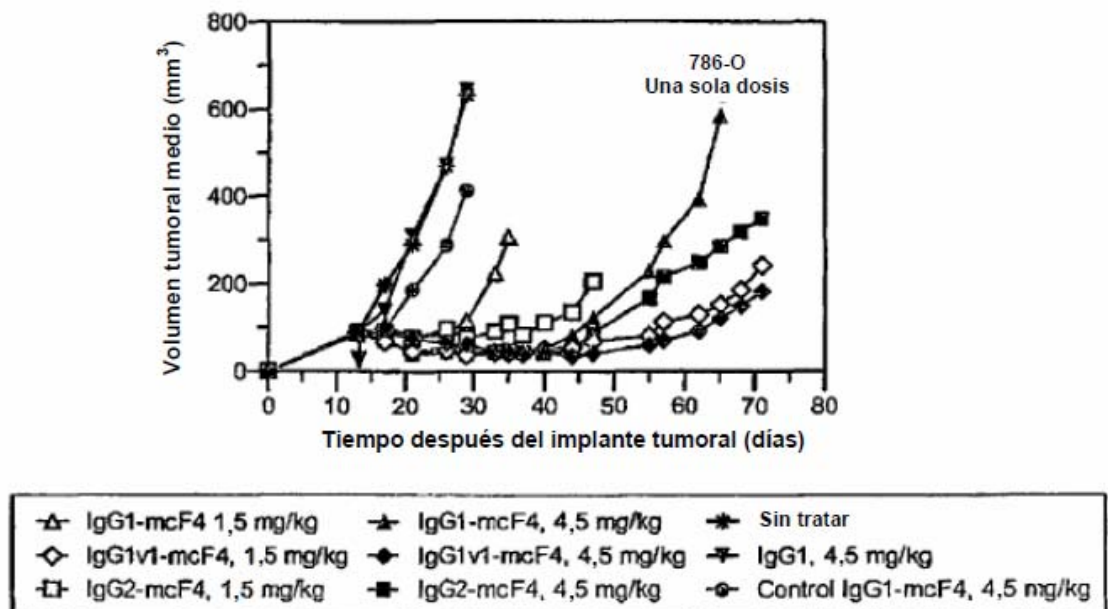


Figura 15

Evaluación de conjugados del anticuerpo h1F6, mc y vc en ratones desnudos que portan tumores subcutáneos UMRC-3 RCC

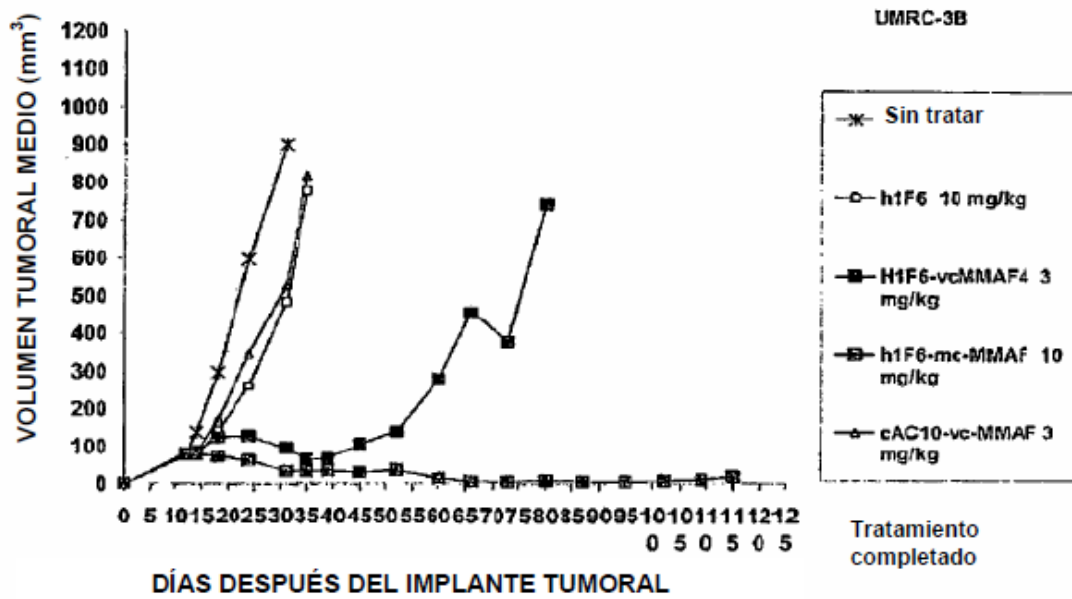


Figura 16A

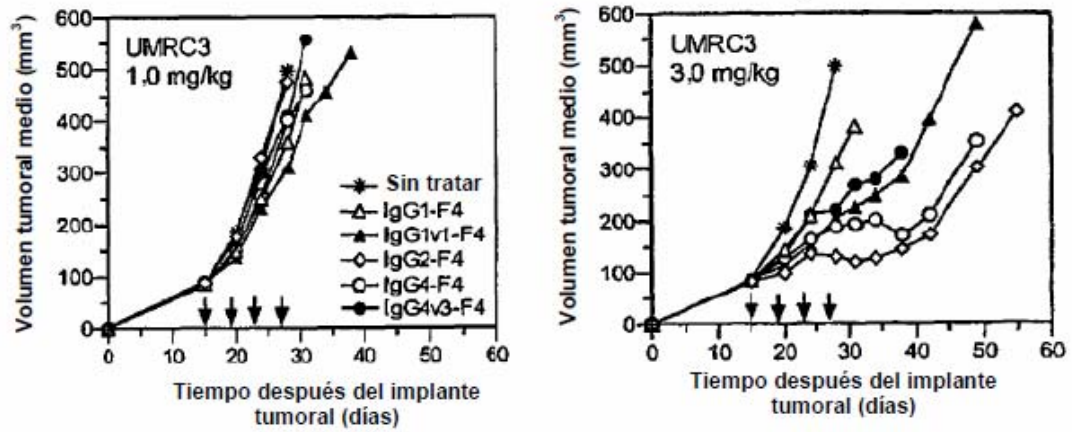


Figura 16B

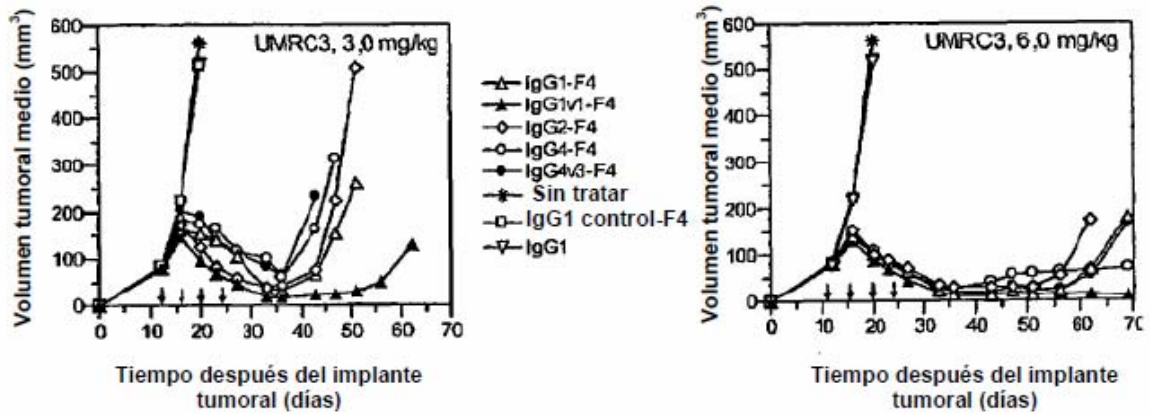
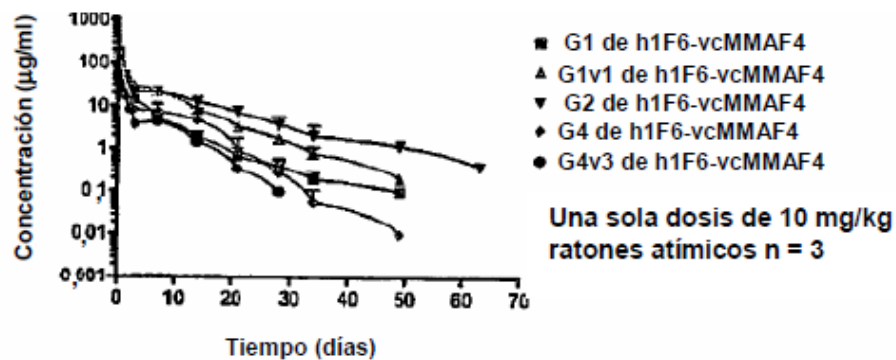


Figura 17

Farmacocinética de los ADC de variantes de h1F6



	Variante de h1F6-vcMMAF4				
	G1	G1v1	G2	G4	G4v3
AUC (µg·ml/día)	200 ± 40	432 ± 33	469 ± 199	204 ± 129	97
Semivida terminal (días)	5,4 ± 1,9	5,3 ± 1,2	5,9 ± 2,0	2,8 ± 0,6	3,7

Eficacia: G1v1 ~ G2 > G1 > G4 ~ G4v3