

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 975 747**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2016** **PCT/US2016/064033**
87 Fecha y número de publicación internacional: **08.06.2017** **WO17095823**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2016** **E 16871367 (5)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024** **EP 3383920**

54 Título: **Administración de carga útil específica de tumor y activación inmunitaria utilizando un anticuerpo humano que se dirige a un antígeno de superficie celular de tumor altamente específico**

30 Prioridad:

30.11.2015 US 201562261112 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.07.2024

73 Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US

72 Inventor/es:

LIU, BIN;
BIDLINGMAIER, SCOTT y
SU, YANG

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 975 747 T3

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

DESCRIPCIÓN

Administración de carga útil específica de tumor y activación inmunitaria utilizando un anticuerpo humano que se dirige a un antígeno de superficie celular de tumor altamente específico

Declaración de ayuda de la administración del estado

La presente invención se realizó con financiación gubernamental mediante las becas números R01 CA129491, R01 CA118919 y R01 CA171315 otorgadas por los Institutos Nacionales de Salud. El Gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

Antecedentes

La terapia contra el cáncer avanza a lo largo de varias plataformas prometedoras, incluidos conjugados de anticuerpos y fármacos (ADC) e inmunoterapia. Para el campo ADC, el desafío es lograr respuestas duraderas. Para la inmunoterapia, si bien la respuesta puede ser duradera, sólo una pequeña fracción de los pacientes tratados responde, y el enfoque funciona sólo para unos pocos tipos de cáncer (Rizvi y col. (2015) *Lancet Oncol.*, 16: 257-265; Topalian y col. (2012) *N. E. J. M.* 366: 2443-2454). Además de desarrollar biomarcadores para predecir los que responden frente a los que no responden, un desafío importante para el campo de la inmunoterapia es aumentar las tasas de respuesta y expandir la aplicabilidad a una gama más amplia de indicaciones.

Para lograr una respuesta duradera con los ADC, el campo tiende a armar anticuerpos con fármacos supertóxicos que matan tanto las células tumorales en división como en reposo (p. ej., PBD y otros quelantes del ADN) y son órdenes de magnitud más potentes que los inhibidores de microtúbulos como los derivados de auristatina (Jeffrey y col. (2013) *Bioconjug. Chem.*, 24: 1256-1263; Kung y col. (2013) *Blood* 122: 1455-1463; Saunders y col. (2015) *Sci. Transl. Med.* 7: 302ra136). Este enfoque puede ser necesario para compensar la relativa ineficiencia de la administración de fármacos mediante la conjugación con un anticuerpo, especialmente en tumores sólidos. Se han informado resultados prometedores de ensayos clínicos con respuestas duraderas utilizando ADC armados con estas supertoxinas tanto en neoplasias malignas hematológicas (CD33-PBD en AML) (Stein y col. (2014) Interim Analysis of a Phase 1 Trial of SGN-CD33A in Patients with CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia (AML). 56a reunión anual de ASH Sesión 616) como en tumores sólidos (DLL3-PBD en cáncer de pulmón neuroendocrino de células pequeñas) (Pietanza y col. (2015) *Eur. J. Canc.* 51(3): S712). Un requisito previo para la adaptación exitosa de este enfoque en otros tumores es la identificación de un antígeno tumoral altamente específico, altamente expresado, de modo que cualquier toxicidad sobre la diana se mantenga en un nivel mínimo.

Hay muchas maneras de mejorar la inmunoterapia actual, incluyendo una mejor comprensión de quién responde versus quién no responde, análisis de la diversificación del repertorio de linfocitos T o el desarrollo de clonalidad en el contexto de la respuesta y la toxicidad, y tratamientos combinados como la combinación de inhibidores de punto de control (CTLA-4 + PD1), inhibidor de punto de control más quimioterapia y vacunas más inhibidor de punto de control. Otro enfoque más para aprovechar el poder del sistema inmunitario del hospedador contra el cáncer se basa en el reclutamiento específico del sitio y la activación de linfocitos T. Por ejemplo, se puede construir un anticuerpo biespecífico combinando fragmentos de anticuerpo anti-tumor y anti-linfocito T (p. ej., CD3) utilizando BiTE (Bispecific T Cell Engager) (Harrington y col. (2015) *PloS One* 10: e0135945; Klinger y col. (2012) *Blood*, 119: 6226-6233; Molhoj y col. (2007) *Mol. Immunol.* 44: 1935-1943) o DART (Dual-Affinity Retargeting) platforms (Chichili y col. (2015) *Sci. Transl. Med.* 7: 289ra282; Moore y col. (2011) *Blood*, 117: 4542-4551). Si bien es prometedor, la aplicación de este enfoque requiere la identificación de un antígeno de superficie de células tumorales altamente específico para minimizar las toxicidades en la diana y expandir la ventana terapéutica.

Ravenni y col. (2014) *mAbs* 6(1): 86-94) divulga el aislamiento, maduración por afinidad y caracterización de dos anticuerpos monoclonales totalmente humanos capaces de unirse a la fosfatasa alcalina placentaria humana (PLAP) con una constante de disociación de 10 y 30 nM, respectivamente.

Sumario

La invención proporciona un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une específicamente a ALPPL2 humana expresada en la placenta expuesta en SEQ ID NO:2, en donde dicho anticuerpo comprende al menos una región variable de cadena pesada (VH) y al menos una región variable de cadena ligera (VL), en donde:

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYA (residuos 26-33 de SEQ ID NO:6), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:6) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 6) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:6), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:6), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTIASLTVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:6) del anticuerpo M25FYIA expuesto en SEQ ID NO:6; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYL (residuos 26-33 de SEQ ID NO:37), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:37) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 37) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:37), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:37), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTIASLTLLV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:37) del anticuerpo M25ALIA expuesto en SEQ ID NO:37; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYL (residuos 26-33 de SEQ ID NO:38), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:38), y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:38), y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO:38) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:38), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:38), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTSTSTFVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:38) del anticuerpo M25ALLF expuesto en SEQ ID NO:38; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYA (residuos 26-33 de SEQ ID NO:39), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:39) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 39) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:39), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:39), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTIASLTLLV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:39) del anticuerpo M25wtIA expuesto en SEQ ID NO:39; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYA (residuos 26-33 de SEQ ID NO:40), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:40) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 40) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:40), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:40), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTSTSTFVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:40) del anticuerpo M25wtLF expuesto en SEQ ID NO:40;

También se proporciona un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo como se define en las reivindicaciones unido a un efector en donde dicho efector se selecciona del grupo que consiste en un segundo anticuerpo, un marcador detectable, una citotoxina o un agente citostático (fármaco), un liposoma que contiene un fármaco, un radionúclido, un fármaco, un profármaco, un inmunomodulador, una partícula vírica, una citocina, un segundo anticuerpo y un quelato.

También se proporciona una formulación farmacéutica, comprendiendo dicha formulación: un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo como se define en las reivindicaciones; y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable y un inmunoconjugado como se define en las reivindicaciones.

También se proporciona un inmunoconjugado como se define en las reivindicaciones, donde: el efector que comprende dicho inmunoconjugado tiene actividad citostática y/o citotóxica y/o actividad inmunomoduladora y el inmunoconjugado es para su uso en la reducción de células iniciadoras de tumores en una población celular; o el efector que comprende dicho inmunoconjugado comprende un marcador detectable y el inmunoconjugado es para su uso en la detección de una célula cancerosa de un cáncer que expresa ALPPL2.

También se proporciona un anticuerpo como se define en las reivindicaciones, y/o un inmunoconjugado anti-ALPPL2 como se define en las reivindicaciones, en donde el efector que comprende dicho inmunoconjugado tiene actividad citostática y/o citotóxica y/o actividad inmunomoduladora para su uso en el tratamiento de cáncer caracterizado por la expresión de ALPPL2.

También se proporciona un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un anticuerpo como se define en las reivindicaciones.

También se proporciona una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR) como se define en las reivindicaciones.

También se proporciona una célula modificada genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) como se define en las reivindicaciones para su uso:

en un método para proporcionar una inmunidad antitumoral contra tumores que expresan ALPPL2, o una región de ALPPL2 unida por el anticuerpo M25AD, M25ADX y/o M25; o

en un método para tratar un mamífero con un cáncer que comprende células que expresan ALPPL2, o una región

de ALPPL2 unida por el anticuerpo M25AD, M25ADX y/o M25; o

en un método para tratar cáncer donde el método comprende poner en contacto la célula modificada mediante ingeniería genética con una célula cancerosa de un mamífero e inducir la apoptosis de la célula cancerosa.

Definiciones

El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. En una realización ilustrativa, el sujeto es un ser humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, *p. ej.*, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, oveja, perro, vaca, pollos, anfibios, reptiles, *etc.*

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un correspondiente aminoácido que se produce de manera natural, así como a polímeros de aminoácidos que se producen de manera natural. El término también incluye variantes del enlace peptídico tradicional que une los aminoácidos que forman el polipéptido.

Los términos "ácido nucleico" u "oligonucleótido" o equivalentes gramaticales en el presente documento se refieren a al menos dos nucleótidos unidos covalentemente entre sí. Un ácido nucleico de la presente divulgación es preferiblemente monocatenario o bicatenario y generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, como se describe a continuación, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden tener estructuras principales alternas, que comprenden, por ejemplo, fosforamida (Beaucage y col. (1993) Tetraedro 49(10):1925) y referencias en el mismo; Letsinger (1970) J. Org. Chem. 35:3800; Sprinzl y col. (1977) Eur. J. Biochem. 81: 579; Letsinger y col. (1986) Nucl. Acids Res. 14: 3487; Sawai y col. (1984) Chem. Lett. 805; Letsinger y col. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110: 4470; y Pauwels y col. (1986) Chemica Scripta 26: 1419), fosforotioato (Mag y col. (1991) Nucleic Acids Res. 19:1437; y patente de los EE.UU. n.º 5.644.048), fosforoditioato (Briu y col. (1989) J. Am. Química. Soc. 111 :2321, enlaces O-metilfosforoamidita (véase Eckstein, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, Oxford University Press), y estructuras principales de ácidos nucleicos peptídicos y enlaces (véase Egholm (1992) J. Am. Chem. Soc. 114:1895; Meier y col. (1992) Chem. Int. Ed. Engl. 31: 1008; Nielsen (1993) Nature, 365: 566; Carlsson y col. (1996) Nature 380: 207). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con estructuras principales positivas (Denpcy y col. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6097; estructuras principales no iónicas (patentes de los EE. UU. n.º 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141 y 4.469.863; Angew. (1991) Chem. Intl. Ed. English 30: 423; Letsinger y col. (1988) J. Am. Chem. Soc. 110:4470; Letsinger y col. (1994) Nucleoside & Nucleotide 13:1597; capítulos 2 y 3, ASC Symposium Series 580, "Carbohydrate Modifications in Antisense Research", Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook; Mesmaeker y col. (1994), Bioorganic & Medicinal Chem. Lett. 4: 395; Jeffs y col. (1994) J. Biomolecular NMR 34:17; Tetrahedron Lett. 37:743 (1996)) y estructuras principales sin ribosa, incluyendo las que se describen en las patentes de Estados Unidos n.º 5.235.033 y 5.034.506, y en los capítulos 6 y 7, ASC Symposium Series 580, Carbohydrate Modifications in Antisense Research, Ed. Y.S. Sanghui y P. Dan Cook. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también están incluidos dentro de la definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins y col. (1995), Chem. Soc. Rev. pág. 169-176). Varios análogos de ácidos nucleicos se describen en Rawls, C & E News 2 de junio de 1997 página 35. Estas modificaciones de la estructura principal de ribosa-fosfato se pueden realizar para facilitar la adición de restos adicionales, como marcadores, o para aumentar la estabilidad y la vida media de dichas moléculas en entornos fisiológicos.

El término "residuo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a aminoácidos naturales, sintéticos o modificados.

Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina o fragmentos de genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulinas reconocidos incluyen los genes de regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de las regiones variables de inmunoglobulinas. Las cadenas ligeras se clasifican en kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican en gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. respectivamente.

Una unidad estructural de una inmunoglobulina (anticuerpo) típica se sabe que comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento de antígenos. Las expresiones de cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a dichas cadenas ligera y pesada, respectivamente.

Los anticuerpos existen como inmunoglobulinas intactas, o en forma de numerosos fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con varias peptidasas. Por lo tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región de bisagra para producir $F(ab)_2$, un dímero de Fab que es, él mismo, una cadena

ligera unida a V_H - C_H1 mediante un enlace disulfuro. El $F(ab)_2$ se puede reducir en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región de bisagra, convirtiendo de ese modo el dímero $F(ab)_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, Fundamental Immunology, W.E. Paul, ed., Raven Press, N. Y. (1993), para una descripción más detallada de otros fragmentos de anticuerpos). Aunque varios fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, el experto en la técnica apreciará que dichos fragmentos Fab' se pueden sintetizar *de novo* bien químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos bien mediante la modificación de los anticuerpos completos, o sintetizados *de novo* usando metodología de ADN recombinante. Ciertos anticuerpos preferidos incluyen anticuerpos de cadena sencilla (anticuerpos que existen como una única cadena polipeptídica), más preferiblemente anticuerpos Fv de cadena sencilla (sFv o scFv) en los que una cadena pesada variable y una cadena ligera variable se unen entre sí (directamente o a través de un conector peptídico) para formar un polipéptido continuo. El anticuerpo Fv de cadena sencilla es un heterodímero V_H - V_L unido covalentemente que puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias que codifican V_H y V_L unidas directamente o unidas mediante un conector que codifica un péptido. Huston, y col. (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU., 85: 5879-5883. Mientras que la V_H y V_L están conectadas entre sí como una sola cadena polipeptídica, los dominios V_H y V_L se asocian de forma no covalente. Las primeras moléculas de anticuerpos funcionales que se expresaron en la superficie de fagos filamentosos fueron los Fv monocatenarios (scFv), sin embargo, las estrategias de expresión alternativas también han tenido éxito. Por ejemplo, las moléculas Fab pueden exhibirse en fagos si una de las cadenas (pesada o ligera) se fusiona con la proteína de la cápside g3 y la cadena complementaria se exporta al periplasma como una molécula soluble. Las dos cadenas pueden codificarse en el mismo o en diferentes replicones; el punto importante es que las dos cadenas de anticuerpos en cada molécula Fab se ensamblan postraduccionalmente y el dímero se incorpora a la partícula del fago mediante la unión de una de las cadenas a, *p. ej.*, g3p (véase, *p. ej.*, patente de los EE.UU. n.º: 5.733.743). Los anticuerpos scFv y una serie de otras estructuras que convierten las cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas agregadas naturalmente, pero separadas químicamente de una región V de anticuerpo en una molécula que se pliega en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno se conocen por los expertos en la materia (véase *por ejemplo*, patente de los EE.UU. n.º 5.091.513, 5.132.405, y 4.956.778). Los anticuerpos particularmente preferidos deben incluir todos los que se han presentado en fagos (*p. ej.*, scFv, Fv, Fab y Fv unido por disulfuro (véase, *p. ej.*, Reiter y col. (1995) Protein Eng. 8: 1323-1331).

La expresión "se une específicamente", como se utiliza en el presente documento, cuando se refiere a una biomolécula (*p. ej.*, proteína, ácido nucleico, anticuerpo, etc.), se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de biomolécula en la población heterogénea de moléculas (*p. ej.*, proteínas y otros productos biológicos). Por lo tanto, bajo condiciones designadas (*p. ej.* condiciones de inmunoensayo en el caso de un anticuerpo o condiciones de hibridación estrictas en el caso de un ácido nucleico), el ligando o anticuerpo especificado se une a su molécula "diana" particular y no se une en una cantidad significativa a otras moléculas presentes en la muestra.

La frase "inhibición de la proliferación de una célula que expresa ALPP y/o ALPPL2", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo o inmunoconjugado anti-ALPP/ALPPL2 descrito en el presente documento para disminuir, preferiblemente para disminuir estadísticamente de manera significativa la proliferación de una célula que expresa ALPP y/o ALPPL2 o un fragmento de la misma con respecto a la proliferación en ausencia del anticuerpo o inmunoconjugado. En un caso, la proliferación de una célula que expresa ALPP/ALPPL2 o un fragmento de la misma (*p. ej.*, una célula cancerosa) puede disminuir en al menos el 10 %, o al menos el 20 %, o al menos el 30 %, o al menos el 40 %, o al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70%, o al menos el 80 %, o al menos el 90 %, o el 100 % cuando las células se ponen en contacto con el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo o un inmunoconjugado descrito en el presente documento, con respecto a la proliferación medida en ausencia del anticuerpo o de su porción de unión a antígeno o inmunoconjugado (control). La proliferación celular se puede analizar utilizando técnicas reconocidas en la técnica que miden la tasa de división celular, la fracción de células dentro de una población celular que se somete a división celular, y/o la tasa de pérdida celular de una población celular debido a la diferenciación terminal o la muerte celular (*p. ej.*, usando un ensayo de brillo de título celular o incorporación de timidina).

La frase "inhibición de la migración de células que expresan ALPP/ALPPL2", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2 o una porción de unión a antígeno del mismo o un inmunoconjugado descrito en el presente documento para disminuir, preferiblemente para disminuir estadísticamente de manera significativa la migración de una célula que expresa ALPP y/o ALPPL2 y/o un fragmento de la misma (*p. ej.* un fragmento unido por M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF) en relación con la migración de la célula en ausencia del anticuerpo. En un aspecto de la divulgación, la migración de una célula que expresa ALPP/ALPPL2 (*p. ej.*, una célula cancerosa) puede disminuir en al menos el 10 %, o al menos el 20 %, o al menos el 30 %, o al menos el 40 %, o al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70%, o al menos el 80 %, o al menos el 90 %, o el 100 % cuando las células se ponen en contacto con el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo o inmunoconjugado del mismo, con respecto a la migración celular medida en ausencia

del anticuerpo o de su porción de unión a antígeno o inmuoconjugado del mismo (control). La migración celular se puede ensayar usando técnicas reconocidas en la técnica. En diversos aspectos de la divulgación, se contempla que los anticuerpos y/o los inmuoconjugados de los mismos descritos en el presente documento pueden inhibir la migración de células (*p. ej.*, células cancerosas como se describe en el presente documento) que expresan o sobreexpresan ALPP y/o ALPPL2, y/o un dominio de ALPP y/o ALPPL2 unido por M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M2530181A, M2530181LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF.

La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente la "parte del anticuerpo"), como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (*p. ej.*, ALPP y/o ALPPL2). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de los fragmentos de unión abarcados en la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (v) un dAb que incluye los dominios V_H y V_L ; (vi) un fragmento dAb (véase, *p. ej.*, Ward y col. (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio V_H ; (vii) un dAb que consiste en un dominio V_H o un dominio V_L ; y (viii) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada o (ix) una combinación de dos o más CDR aisladas que opcionalmente pueden estar unidas mediante un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , pueden estar codificados por genes distintos, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) Science 242: 423-426; y Huston y col. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). También se pretende que los anticuerpos de cadena única estén abarcados dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por aquellos expertos en la materia y se seleccionan en función de su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos. Las partes de unión a antígeno se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante, o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, *es decir*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos salvo por las posibles mutaciones que tienen lugar de manera natural que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, al contrario de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando cualquier técnica reconocida en la materia y las descritas en el presente documento, tales como, por ejemplo, un método de hibridoma, tal como se describe por Kohler y col. (1975) Nature, 256: 495, un animal transgénico, tal como se describe por, por ejemplo, (véase, por ejemplo, Lonberg, y col. (1994) Nature 368(6474): 856-859), métodos del ADN recombinante (véase, *p. ej.*, patente de los EE.UU. n.º 4.816.567), o usando bibliotecas de anticuerpos de fago usando las técnicas descritas en, por ejemplo, Clackson y col. (1991) Nature, 352: 624-628, y Marks y col. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581-597. Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanos y los anticuerpos humanizados y pueden darse de manera natural o producirse de manera recombinante.

El término "anticuerpo recombinante", se refiere a anticuerpos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcrómico para genes de inmunoglobulina (por ejemplo, genes de inmunoglobulina humana) o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, *p. ej.*, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante (*p. ej.*, que contiene secuencias de anticuerpos humanos) usando presentación en fagos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina (*p. ej.* genes de inmunoglobulina humana) con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos recombinantes pueden tener regiones variables y constantes que provienen de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En determinados aspectos de la divulgación, sin embargo, tales anticuerpos recombinantes humanos se pueden someter a mutagénesis *in vitro* y, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de, y están relacionadas con, las secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, no pueden existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

La expresión "inmunoglobulina quimérica" o anticuerpo se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo cuyas regiones variables provienen de una primera especie y cuyas regiones constantes provienen de una segunda especie. Las

inmunoglobulinas o los anticuerpos quiméricos se pueden construir, por ejemplo, por ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de inmunoglobulinas que pertenecen a especies diferentes.

La expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones marco como las regiones CDR provienen de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana tal como se describe, por ejemplo, por Kabat y col. (véase Kabat, y col. (1991) Sequences of proteins of Immunological Interest, Quinta edición, Departamento de salud y servicios humanos de los Estados Unidos, Publicación NIH n.º 91-3242). Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también proviene de las secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (*p. ej.*, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como de un ratón, se han injertado en secuencias flanqueantes humanas.

El anticuerpo humano puede tener al menos uno o más aminoácidos sustituidos por un resto de aminoácido, *p. ej.*, un resto de aminoácido que mejora la actividad y que no está codificado por la secuencia de inmunoglobulinas de la línea germinal. Normalmente, el anticuerpo humano puede tener hasta veinte posiciones sustituidas con restos de aminoácidos que no son parte de la secuencia de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En un aspecto particular de la divulgación, estas sustituciones están en las regiones CDR tal como se describe en detalle a continuación.

La expresión "inmunoglobulina humanizada" o "anticuerpo humanizado" se refiere a una inmunoglobulina o anticuerpo que incluye al menos una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo humanizada (*es decir*, al menos una cadena ligera o pesada humanizada). El término "cadena de inmunoglobulina humanizada" o "cadena de anticuerpos humanizada" (*es decir*, una "cadena ligera de inmunoglobulina humanizada" o "cadena pesada de inmunoglobulina humanizada") se refiere a una cadena de inmunoglobulina o anticuerpo (*es decir*, una cadena ligera o pesada, respectivamente) que tiene una región variable que incluye una región marco variable sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad (CDR) (*p. ej.*, al menos una CDR, preferentemente dos CDR, más preferentemente tres CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano y adicionalmente incluye regiones constantes (por ejemplo, al menos una región constante o una parte de la misma, en el caso de una cadena ligera y preferentemente tres regiones constantes en el caso de una cadena pesada). La expresión "región variable humanizada" (por ejemplo, "región variable de cadena ligera humanizada" o "región variable de cadena pesada humanizada") se refiere a una región variable que incluye una región marco sustancialmente variable de una inmunoglobulina o anticuerpo humano y regiones determinantes de complementariedad (CDR) sustancialmente de una inmunoglobulina o anticuerpo no humano.

Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con el organismo no humano o planta transgénicos que producen tal anticuerpo.

Un "anticuerpo aislado", como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (*p. ej.*, un anticuerpo aislado que se une específicamente a ALPP y/o ALPL2 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de ALPP y/o ALPL2). Además, un anticuerpo aislado típicamente es sustancialmente libre de otro material celular y/o compuesto químico. En un aspecto de la divulgación, una composición de anticuerpos monoclonales "aislados" que tiene diferentes especificidades de unión a ALPP/ALPL2 se combinan en una composición bien definida.

Como se utiliza en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (*por ejemplo*, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada. En una realización, un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo es de un isotipo seleccionado de una IgG1, una IgG2, una IgG3, una IgG4, una IgM, una IgA1, una IgA2, una IgAsec, una IgD o un isotipo de anticuerpo IgE. En algunas realizaciones, un anticuerpo monoclonal de la invención es del isotipo IgG1. En otras realizaciones, un anticuerpo monoclonal de la invención es del isotipo IgG2.

Un "antígeno" es una entidad (*p. ej.*, una entidad proteica o un péptido) al que se une un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo. Como se establece en las reivindicaciones, el anticuerpo o fragmento del mismo se une a ALPPL2 humana expresada en la placenta. En diversos aspectos de la presente divulgación, un antígeno es ALPP y/o ALPPL2, y/o un dominio de ALPP y/o ALPPL2 unido por M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF, *p. ej.*, tal como se presenta en una célula (*p. ej.*, una célula cancerosa positiva para ALPPL2).

El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un lugar sobre un antígeno al que se une de manera

específica una inmunoglobulina o anticuerpo. Los epítomos pueden formarse tanto a partir de aminoácidos contiguos como a partir de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante el plegamiento terciario de una proteína. Los epítomos formados a partir de aminoácidos contiguos típicamente se mantienen al tratarlos con disolventes desnaturizantes, mientras que los epítomos formados mediante plegamiento terciario típicamente se pierden en el tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítomo incluye normalmente al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de un epítomo incluyen las técnicas en la materia y las descritas en el presente documento, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional (véase, *p. ej.*, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

También se contemplan en el presente documento anticuerpos que se unen al mismo epítomo o a uno superpuesto que los anticuerpos M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF descritos en el presente documento. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítomo se pueden identificar usando técnicas habituales tales como un inmunoensayo, por ejemplo, demostrando la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la inmunoglobulina que se está analizando inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tales como ALPP y/o ALPPL2. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo: radioinmunoensayo (RIA, del inglés *radioimmunoassay*) directo o indirecto en fase sólida, inmunoensayo enzimático (EIA, del inglés *enzyme immunoassay*) directo o indirecto en fase sólida, ensayo de competición en sándwich (véase, *p. ej.*, Stahli y col. (1983) Meth. Enzymol., 9: 242); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (véase Kirkland y col., (1986) J. Immunol. 137: 3614); ensayo de marcaje directo en fase sólida, ensayo en sándwich de marcaje directo en fase sólida (véase, *p. ej.*, Harlow y Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press); ensayo RIA de marcaje directo en fase sólida que usa, *p. ej.*, marcador ^{125}I (véase, *p. ej.*, Morel y col., (1988) Mol. Immunol. 25(1): 7); EIA de biotina-avidina directo en fase sólida (Cheung y col. (1990) Virology 176: 546); y RIA de marcaje directo. (Moldenhauer y col. (1990) Scand J. Immunol. 32: 77). Normalmente, tal ensayo implica el uso de antígeno purificado (por ejemplo, APPL y/o APPL2) unido a una superficie sólida o a células que lleven cualquiera de ellos, una inmunoglobulina de ensayo sin marcar y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marcador unido a la superficie sólida o a las células en presencia de la inmunoglobulina de ensayo. Normalmente, la inmunoglobulina de ensayo está presente en exceso. Normalmente, cuando un anticuerpo competitivo está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia con un antígeno común en al menos el 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 % 70-75 % o más.

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "unión específica", "se une de manera específica", "unión selectiva", y "se une selectivamente", significa que un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo, presenta una afinidad apreciable por un antígeno o epítomo en particular y, en general, no presenta una reactividad cruzada significativa con otros antígenos y epítomos. La unión "apreciable" o preferida incluye la unión con una afinidad de al menos (K_D igual o menor que) 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M o 10^{-11} M. Afinidades mayores que 10^{-9} M, preferentemente, las afinidades mayores de 10^{-10} M son más preferidas. Los valores intermedios de éstos expuestos en el presente documento también pretenden estar dentro del alcance de la presente invención y se puede indicar una afinidad de unión preferida como un intervalo de afinidades, por ejemplo, 10^{-6} M a 10^{-11} M, preferiblemente 10^{-7} M o 10^{-8} M a 10^{-10} M. Un anticuerpo que "no presenta una reactividad cruzada significativa" es el que no se unirá de manera apreciable a una entidad indeseable (por ejemplo, una entidad proteica indeseable). Por ejemplo, en un aspecto de la divulgación, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a ALPP y/o ALPPL2 pero no reaccionará significativamente con otras moléculas y proteínas o péptidos ALPP/ALPPL2. La unión específica o selectiva se puede determinar de acuerdo con cualquiera de los medios reconocidos en la materia para determinar tal unión, que incluye, por ejemplo, de acuerdo con el análisis de Scatchard y/o los ensayos de unión competitiva.

El término " K_D ", como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación en el equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular o la afinidad de un anticuerpo por un antígeno. En un aspecto, el anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente divulgación se une a un antígeno (*p. ej.*, ALPP y/o ALPPL2) o una célula que expresa el antígeno con una afinidad (K_D) de 5 nM o mejor (es decir, o menos) (*por ejemplo*, 40 nM o 30 nM o 20 nM o 10 nM o menos), tal como se mide usando un ensayo de resonancia de plasmón superficial o un ensayo de unión celular. En un aspecto particular, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo de acuerdo con la presente divulgación se une a ALPP y/o ALPPL2, y/o un dominio de ALPP y/o ALPPL2 unido por M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF con afinidad (K_D) de 5 nM o mejor (*p. ej.*, 4 nM, 2 nM, 1,5 nM, 1,4 nM, 1,3 nM, 1 nm o menos), tal como se mide mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial o un ensayo de unión celular. En otros aspectos, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se une a un antígeno (*p. ej.*, ALPP y/o ALPPL2) con afinidad (K_D) de aproximadamente menos de 10^{-10} M, o 100×10^{-11}

M, o 10×10^{-11} M, o incluso menor utilizando células tumorales de próstata vivas mediante FACS.

El término " K_{off} ", como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a la constante de la tasa de disociación para la disociación de un anticuerpo a partir del complejo anticuerpo/antígeno.

El término "CE50", como se utiliza en el presente documento, se refiere a la concentración de un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo o un inmunocombinado descrito en el presente documento, que induce una respuesta, bien en un ensayo *in vitro* o en un ensayo *in vivo*, que es el 50 % de la respuesta máxima, es decir, a medio camino entre la respuesta máxima y la de partida.

La expresión "de origen natural" tanto usada en el presente documento como aplicada a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede hallar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o de polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo a los virus) que se puede aislar de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionadamente por el ser humano en el laboratorio es de origen natural.

El término "modificador", o "modificación", como se utiliza en el presente documento, pretenden referirse a cambiar uno o más aminoácidos en los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos. El cambio se puede producir mediante adición, sustitución o delección de un aminoácido en una o más posiciones. El cambio se puede producir usando técnicas conocidas, tales como mutagénesis de PCR. Por ejemplo, en algunos aspectos, un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo identificado" utilizando los métodos descritos en el presente documento puede modificarse, para modificar de ese modo la afinidad de unión del anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo a ALPP/ALPPL2.

En ciertos aspectos de la divulgación, "sustituciones de aminoácidos conservadoras" en las secuencias de los anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 descritos en el presente documento, es decir, se contemplan las modificaciones de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos que no anulan la unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contienen la secuencia de aminoácidos, al antígeno, *p. ej.*, ALPP/ALPPL2. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen la sustitución de un aminoácido en una clase por un aminoácido de la misma clase, en donde una clase se define mediante las propiedades fisicoquímicas de la cadena lateral de aminoácidos y las altas frecuencias de sustitución en proteínas homólogas halladas en la naturaleza, tal como se determina, por ejemplo, mediante una matriz convencional de frecuencias de intercambio de Dayhoff o matriz BLOSUM. Se han categorizado seis clases generales de cadenas laterales de aminoácidos e incluyen: Clase I (Cys); Clase II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Clase III (Asn, Asp, Gln, Glu); Clase IV (His, Arg, Lys); Clase V (Ile, Leu, Val, Met); y Clase VI (Phe, Tyr, Trp). Por ejemplo, la sustitución de un Asp por otro resto de la clase III tal como Asn, Gln o Glu, es una sustitución conservativa. Por lo tanto, un resto de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2 se sustituye preferiblemente con otro resto de aminoácido de la misma clase. Los métodos para identificar sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión a antígeno son bien conocidas en la materia (véase, *p. ej.*, Brummell y col. (1993) *Biochem.* 32: 1180-1187; Kobayashi y col. (1999) *Protein Eng.* 12(10): 879-884; y Burks y col. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417).

La expresión "sustitución de aminoácidos no conservativa" se refiere a la sustitución de un aminoácido de una clase con un aminoácido de otra clase; por ejemplo, la sustitución de una Ala, un resto de la clase II, por un resto de la clase III tal como Asp, Asn, Glu o Gln.

En otro aspecto de la divulgación, las mutaciones (conservativas o no conservativas) se pueden introducir de manera aleatoria a lo largo de toda o de una parte de la secuencia codificante del anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los anticuerpos resultantes modificados se pueden seleccionar en función de la actividad de unión.

Una "secuencia consenso" es una secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que se dan con más frecuencia en una familia de secuencias relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987). En una familia de proteínas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que se da con más frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos se dan con la misma frecuencia por igual, se puede incluir cualquiera de ellos en la secuencia consenso. Un "marco consenso" de una inmunoglobulina se refiere a una región marco en la secuencia consenso de la inmunoglobulina.

Análogamente, la secuencia consenso para las CDR puede derivarse mediante alineación óptima de las secuencias de aminoácidos de las CDR de los anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 descritos en el presente documento.

Para los ácidos nucleicos, el término "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean y comparan de manera óptima, son idénticos, con inserciones o eliminaciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 80 % de los nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente del 90 % al 95 %, y más preferiblemente al menos aproximadamente del 98 % al 99,5 % de los nucleótidos. Como alternativa, existe una homología sustancial cuando los segmentos se hibridarán en condiciones de hibridación selectivas, al complemento de la cadena.

La identidad porcentual entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = $n.^{\circ}$ de posiciones idénticas/ $n.^{\circ}$ de posiciones totales x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesita introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. Puede realizarse la comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar utilizando el programa GAP en el software GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de espacio de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos también se puede determinar utilizando el algoritmo de Meyers y Miller (1989) CABIOS, 4: 11-17, que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización de longitud por hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 444-453 algoritmo que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y un peso de espacio de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Las secuencias de ácido nucleico y proteínas del contemplado en el presente documento puede usarse además como una "secuencia problema" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Estas búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, y col. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la divulgación. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la divulgación. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul y col., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden utilizarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (*p. ej.*, XBLAST y NBLAST).

Las composiciones de ácidos nucleicos descritas en el presente documento (*p. ej.*, ácidos nucleicos que codifican todo o una porción de un anticuerpo o inmunoconjugado anti-ALPP/ALPPL2) mientras que a menudo están en una secuencia nativa (excepto sitios de restricción modificados y similares), de cualquier ADNc, genómicos o mezclas de las mismas pueden estar mutadas, de acuerdo con técnicas estándar para proporcionar secuencias variantes. Para secuencias codificantes, estas mutaciones, pueden afectar la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, secuencias de ADN sustancialmente homólogas o derivadas de V nativo, D, J, constante, Se contemplan interruptores y otras secuencias similares descritas en el presente documento (donde "derivado" indica que una secuencia es idéntica o está modificada a partir de otra secuencia).

El término "unido operativamente" se refiere a una secuencia de ácido nucleico colocada en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder de secreción está operativamente unido al ADN de un polipéptido si se expresa en forma de una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia de codificación si altera la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia de codificación si está colocado de manera que facilite la traducción. En general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder de secreción, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. La unión se realiza mediante ligadura en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica habitual. Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se pone en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia de codificación si altera la transcripción de la secuencia. Con respecto a las secuencias reguladoras transcripcionales, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en marco de lectura. Para secuencias interruptoras, unido operativamente indica que las secuencias son capaces de efectuar una recombinación de interrupción.

El término "vector", como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un "plásmido" es un tipo de vector, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora en la que se introducen (*p. ej.*, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamíferos). Otros vectores (*p. ej.*, vectores no episómicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y de este modo se replican junto con el genoma del hospedador. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se citan en el presente documento como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante se encuentran normalmente en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente. Sin embargo, la divulgación tiene como objetivo incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (*p. ej.*, retrovirus

defectuosos para la replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que tienen funciones equivalentes.

La expresión "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión. Debe entenderse que dichos términos pretenden hacer referencia no solo a la célula concreta, sino también a la descendencia de dicha célula. Debido a que pueden producirse determinadas mutaciones en generaciones posteriores debido a una mutación o a influencias ambientales, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluyen dentro del alcance de la expresión "célula hospedadora", tal como se usa en el presente documento.

Los términos "tratar", "que trata", y "tratamiento", como se utiliza en el presente documento, se refieren a las medidas terapéuticas o preventivas descritas en el presente documento. Los métodos de "tratamiento" emplean la administración a un sujeto (*p. ej.*, un sujeto que lo necesite), de un anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2 o una porción de unión a antígeno o un inmunoconjugado que comprende dicho anticuerpo o porción de unión a antígeno descrito en el presente documento. En determinados aspectos de la divulgación, el sujeto es un sujeto diagnosticado con y/o bajo tratamiento para un cáncer positivo para ALPPL2 (*p. ej.*, mesotelioma) para prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad de, o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno o enfermedad o trastorno recurrente, o para prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Un cáncer positivo para ALPP o ALPPL2 se refiere a un cáncer caracterizado por células que expresan o sobreexpresan ALPP y/o ALPPL2 o un fragmento de las mismas unidas por M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF descritos en el presente documento. Los cánceres positivos para ALPPL2 ilustrativos incluyen, pero sin limitación, mesotelioma, cáncer de testículos, cáncer de endometrio y un subconjunto de cáncer de páncreas, cáncer de ovario y cáncer de pulmón no microcítico.

El término "cantidad efectiva", como se utiliza en el presente documento, se refiere a esa cantidad de un anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2 o una porción de unión a antígeno del mismo y/o un inmunoconjugado del mismo, que es suficiente para efectuar el tratamiento, pronóstico o diagnóstico de una enfermedad asociada con el crecimiento y/o proliferación de células positivas para ALPP/ALPPL2 (*p. ej.*, un cáncer positivo para ALPP/ALPPL2), como se describe en el presente documento, cuando se administra a un sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz variará dependiendo del sujeto y la afección de la enfermedad que se esté tratando, del peso y de la edad del sujeto, la gravedad de la afección de la enfermedad, de la forma de administración y similares, que se puede determinar fácilmente por el experto en la técnica. Las dosificaciones para la administración pueden variar de, por ejemplo, aproximadamente 1 ng a aproximadamente 10.000 mg, de aproximadamente 5 ng a aproximadamente 9.500 mg, de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 9.000 mg, de aproximadamente 20 ng a aproximadamente 8.500 mg, de aproximadamente 30 ng a aproximadamente 7.500 mg, de aproximadamente 40 ng a aproximadamente 7.000 mg, de aproximadamente 50 ng a aproximadamente 6.500 mg, de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 6.000 mg, de aproximadamente 200 ng a aproximadamente 5.500 mg, de aproximadamente 300 ng a aproximadamente 5.000 mg, de aproximadamente 400 ng a aproximadamente 4.500 mg, de aproximadamente 500 ng a aproximadamente 4.000 mg, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 3.500 mg, de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 3.000 mg, de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 2.600 mg, de aproximadamente 20 µg a aproximadamente 2.575 mg, de aproximadamente 30 µg a aproximadamente 2.550 mg, de aproximadamente 40 µg a aproximadamente 2.500 mg, de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 2.475 mg, de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 2.450 mg, de aproximadamente 200 µg a aproximadamente 2.425 mg, de aproximadamente 300 µg a aproximadamente 2.000, de aproximadamente 400 µg a aproximadamente 1.175 mg, de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 1.150 mg, de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 1.125 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 1.100 mg, de aproximadamente 1,25 mg a aproximadamente 1.075 mg, de aproximadamente 1,5 mg a aproximadamente 1.050 mg, de aproximadamente 2,0 mg a aproximadamente 1.025 mg, de aproximadamente 2,5 mg a aproximadamente 1.000 mg, de aproximadamente 3,0 mg a aproximadamente 975 mg, de aproximadamente 3,5 mg a aproximadamente 950 mg, de aproximadamente 4,0 mg a aproximadamente 925 mg, de aproximadamente 4,5 mg a aproximadamente 900 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 875 mg, de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 850 mg, de aproximadamente 20 mg a aproximadamente 825 mg, de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 800 mg, de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 775 mg, de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 750 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 725 mg, de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 700 mg, de aproximadamente 300 mg a aproximadamente 675 mg, de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 650 mg, de aproximadamente 500 mg, o de aproximadamente 525 mg a aproximadamente 625 mg, de un anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2 descrito en el presente documento y/o porción de unión a antígeno del mismo, y/o inmunoconjugado del mismo como se describe en el presente documento. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial (es decir, efectos secundarios) de un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo se minimiza y/o se compensa mediante los efectos beneficiosos.

Un "efector" se refiere a cualquier molécula o combinación de moléculas cuya actividad se desea administrar/dentro de y/o localizar en la célula. Los efectores incluyen, pero sin limitación a marcadores, citotoxinas, enzimas, factores de crecimiento, factores de transcripción, anticuerpos, fármacos, etc.

- 5 La frase "que inhiben el crecimiento y/o la proliferación", *p. ej.* de células cancerosas incluye *inter alia* inducir apoptosis celular u otros mecanismos de destrucción celular, reducir la invasividad de las células, detener las células en un punto del ciclo celular, y similares.

10 El término "inmunoconjugado" se refiere a un anticuerpo unido a uno o más efectores o a una pluralidad de anticuerpos unidos a uno o más efectores. Se pretende que el término "inmunoconjugado" incluya efectores químicamente conjugados con los anticuerpos, así como anticuerpos que se expresan como una proteína de fusión donde el anticuerpo (o una porción del mismo) está directamente unido o unido a través de un conector a un efector peptídico o a un efector que comprende un péptido.

15 El término "efecto anti-tumoral", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un efecto biológico que puede manifestarse por una disminución del volumen del tumor, una disminución del número de células tumorales, una disminución del número de metástasis, un aumento de la esperanza de vida o una mejora de diversos síntomas fisiológicos asociados con la afección cancerosa. Un "efecto anti-tumoral" también puede manifestarse por la capacidad de los anticuerpos, inmunoconjugados, células CAR descritos en el presente documento en prevenir en
20 primer lugar la aparición de tumores.

El término "autólogo" pretende referirse a cualquier material derivado del mismo individuo al que posteriormente se le reintroducirá en el individuo.

- 25 El término "allogénico" se refiere a una célula o injerto derivado de un animal diferente de la misma especie.

El término "xenogénico" se refiere a una célula o injerto derivado de un animal de una especie diferente.

30 El término "ligando co-estimulador", como se usa el término en el presente documento, incluye una molécula en una célula presentadora de antígeno (*p. ej.*, un APC, célula dendrítica, célula B, y similares) que se une específicamente a una molécula coestimuladora similar en un linfocito T, proporcionando así una señal de que, además de la señal primaria proporcionada por, por ejemplo, unión de un complejo TCR/CD3 con una molécula MHC cargada con péptido, media una respuesta de linfocitos T, que incluye, pero sin limitación, proliferación, activación, diferenciación y similares. Un ligando co-estimulador puede incluir, pero sin limitación, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), PD-L1, PD-L2, 4-1BBL, OX40L, ligando co-estimulador inducible (ICOS-L), molécula de adhesión intracelular (ICAM), CD30L, CD40, CD70, CD83, HLA-G, MICA, MICB, HVEM, receptor linfotóxica beta, TR6, ILT3, ILT4, un agonista o anticuerpo que se une al receptor del ligando Toll y un ligando que se une específicamente con B7-H3. Un ligando co-estimulador también abarca, *inter alia*, un anticuerpo que se une específicamente con una molécula co-estimuladora presente en un linfocito T, tal como, pero sin limitación, CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 y un ligando que se une específicamente con CD83.

40 Una "molécula co-estimuladora" se refiere al asociado de unión afín en un linfocito T que se une específicamente con un ligando co-estimulador, mediando así una respuesta co-estimuladora por parte del linfocito T, tal como, pero sin limitación, proliferación. Las moléculas co-estimuladoras incluyen, pero sin limitación, una molécula de MHC clase I, BTLA y un receptor de ligando Toll.

Una "señal co-estimuladora", como se utiliza en el presente documento, se refiere a una señal, que en combinación con una señal primaria, como la ligadura de TCR/CD3, conduce a la proliferación de linfocitos T y/o a la regulación por incremento o regulación por disminución de moléculas clave.

50 Mediante el término "estimulación", se quiere decir una respuesta primaria inducida por la unión de una molécula estimulante (*p. ej.*, un complejo TCR/CD3) con su ligando afín mediando así un acontecimiento de transducción de señales, tal como, pero sin limitación, transducción de señales a través del complejo TCR/CD3. La estimulación puede mediar la expresión alterada de ciertas moléculas, tal como la regulación por disminución de TGF- β y/o la reorganización de estructuras citoesqueléticas y similares.

Una "molécula estimuladora", como se usa el término en el presente documento, significa una molécula en un linfocito T que se une específicamente con un ligando estimulador afín presente en una célula presentadora de antígeno.

60 Un "ligando estimulador", como se utiliza en el presente documento, significa un ligando que cuando está presente en una célula presentadora de antígeno (*p. ej.*, un APC, una célula dendrítica, un linfocito B, y similares) puede unirse específicamente con un asociado de unión afín (denominado en el presente documento "molécula estimuladora") en un linfocito T, mediando así una respuesta primaria del linfocito T, que incluye, pero sin limitación, activación, iniciación de la respuesta inmunitaria, proliferación y similares. Los ligandos estimuladores son bien conocidos en la técnica y abarcan, *inter alia*, una molécula de MHC Clase I cargada con un péptido, un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28 superagonista y/o un anticuerpo anti-CD2 superagonista.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra las secuencias de aminoácidos de ALPP (SEQ ID NO:1) y ALPPL2 (SEQ ID NO:2).

La Figura 2 ilustra la destrucción de células tumorales potente y específica *in vitro*. MMAF se conjugó con la M25 IgG1 mediante el conector mc-vc-pab, se purificó y se incubó con la línea de células de mesotelioma M28 y células de control (HS775Li, una línea de células primarias de hígado humano, y HS27, una línea de células de fibroblastos de prepucio). Hay una diferencia de más de 1.000 veces en las CE50 entre las células tumorales y las células no tumorigénicas de control (0,54 nM frente a $> 1 \mu\text{M}$), lo que demuestra una destrucción tumoral potente y selectiva por parte de nuestro novedoso ADC.

Las Figuras 3A y 3B muestran que el ADC anti-ALLP/ALPPL2 inhibe potentemente el crecimiento del xenoinjerto tumoral *in vivo*. La Figura 3A muestra las medias geométricas de los volúmenes tumorales. La inyección comenzó el día 7, cada 5 días, para 5 dosis de 5 mg/kg por ratón. M25mcvcpcbMMAF: la prueba ADC (MMAF conjugado con M25 IgG1). IgG: control M25 IgG1 desnudo. Figura 3B: Se controlaron y representaron los pesos corporales de los animales. No se observaron signos evidentes de toxicidad. Nota: en el experimento mostrado en A y B, no se incluyó un ADC de control (IgG1-mcvcpcb-MMAF ctr), pero hemos estudiado el ADC de control en otros experimentos: se comporta de manera similar al del vehículo o al control de IgG desnudo).

La Figura 4 ilustra la evaluación de ADC basado en MMAE en el modelo de xenoinjerto de mesotelioma. Se inyectó M25AD-mcvcpcb-MMAE en 3 mg/kg cada 3-4 días durante 5 veces. Se utilizó como control un IgG1-mcvcpcb-MMAE de no unión.

La Figura 5 muestra FACS de nuestro anticuerpo M25 anti-ALPPL2 en líneas de mesotelioma, de cáncer pancreático y de pulmón no microcítico.

La Figura 6 muestra las curvas de destrucción de M25AD-MMAF y -MMAE en líneas de cáncer pancreático (Capan-1, paneles A y B) y de pulmón no microcítico (H1651, paneles C y D). Todos los conjugados son IgG1-mcvcpcb-MMAF (paneles A y C) o MMAE (paneles B y D).

La Figura 7 muestra el análisis FACS de la unión de M25ADLF IgG1 a células HEK293 vivas transfectadas con plásmido que expresa ALPPL2, junto con un plásmido que expresa la proteína de fluorescencia verde (GFP). Las células se incubaron con anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 h en PBS/suero de ternera fetal al 0,2 %, se lavaron tres veces y se incubaron adicionalmente con anticuerpo secundario anti-humano marcado con ALEXAFLOU®-647. Las células GFP+ se seleccionaron y analizaron para determinar la intensidad de fluorescencia media (MFI). Se usó MFI normalizada para ajustar la curva usando Prism (GraphPad) para derivar el valor KD aparente de $17,04 \pm 6,18 \text{ pM}$. Se obtuvieron resultados de unión similares en células transfectadas con ALPP. No hay unión a células transfectadas con ALPL. La unión a células transfectadas con ALPI tiene un valor KD aparente $> 5 \mu\text{M}$.

La Figura 8 muestra el análisis FACS de la unión de M25FYIA IgG1 a células HEK293 vivas transfectadas con plásmido que expresa ALPPL2, junto con un plásmido que expresa la proteína de fluorescencia verde (GFP). Las células se incubaron con anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 h en PBS/suero de ternera fetal al 0,2 %, se lavaron tres veces y se incubaron adicionalmente con anticuerpo secundario anti-humano marcado con ALEXAFLOU®-647. Las células GFP+ se seleccionaron y analizaron para determinar la intensidad de fluorescencia media (MFI). Se usó MFI normalizada para ajustar la curva usando Prism (GraphPad) para derivar el valor KD aparente de $20,36 \pm 7,85 \text{ pM}$. Se obtuvieron resultados de unión similares en células transfectadas con ALPP. No hay unión a células transfectadas con ALPL. La unión a células transfectadas con ALPI tiene un valor KD aparente $> 3,3 \mu\text{M}$.

La Figura 9 muestra el análisis FACS de la unión de M25 IgG1 a células HEK293 vivas transfectadas con plásmido que expresa ALPPL2, junto con un plásmido que expresa la proteína de fluorescencia verde (GFP). Las células se incubaron con anticuerpo a temperatura ambiente durante 1 h en PBS/suero de ternera fetal al 0,2 %, se lavaron tres veces y se incubaron adicionalmente con anticuerpo secundario anti-humano marcado con ALEXAFLOU®-647. Las células GFP+ se seleccionaron y analizaron para determinar la intensidad de fluorescencia media (MFI). Se usó MFI normalizada para ajustar la curva usando Prism (GraphPad) para derivar el valor KD aparente de $506,1 \pm 55,95 \text{ pM}$. Se obtuvieron resultados de unión similares en células transfectadas con ALPP. No hay unión a células transfectadas con ALPL o ALPI.

Descripción detallada

Se divulgan anticuerpos que se unen a antígenos de la superficie celular que están sobreexpresados por células tumorales con expresión mínima o nula en tejidos humanos normales. Los anticuerpos se pueden utilizar solos en el tratamiento de cánceres. Otros usos divulgados en este documento incluyen, pero sin limitación:

- 1) Uso para administración de carga útil (*p. ej.*, fármaco, ARNip, ARNm, citocina, radionúclido) a una célula tumoral;
- 2) Uso como componentes de un anticuerpo biespecífico u oligoespecífico que activa selectivamente el sistema inmunitario en el sitio del tumor;
- 3) Uso en la construcción de receptores de antígenos quiméricos (T-CAR) para terapias basadas en células;
- 4) Uso en la construcción de anticuerpos biespecíficos; y
- 5) Uso como herramientas de diagnóstico/estadificación para la detección/cuantificación de tumores y para la estratificación de pacientes y el análisis de resultados.

A través de la selección de bibliotecas de presentación de anticuerpos en fagos en células tumorales vivas y muestras de cáncer, hemos identificado un anticuerpo anti-ALPPL2 novedoso. ALPPL2 se expresa específicamente en varios tipos de cáncer incurable, pero no en tejidos humanos normales, excepto en los trofoblastos placentarios. La exquisita especificidad tisular de ALPPL2 debería facilitar la preparación de terapias dirigidas e inmunoterapia altamente específicas contra los cánceres que sobreexpresan este antígeno. Tales cánceres incluyen, pero sin limitación a mesotelioma, cáncer de testículos, cáncer de endometrio y un subconjunto de cáncer de páncreas, cáncer de ovario y cáncer de pulmón no microcítico. Como se ilustra en los Ejemplos en el presente documento, se ha demostrado la capacidad de dirigirse del antígeno *in vitro* e *in vivo* con conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) utilizando derivados de auristatina.

Por consiguiente, en diversos aspectos de la divulgación, se proporcionan anti-ALPP/ALPPL2 aislados, así como restos quiméricos que comprenden los anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 unidos a un efector. En ciertos aspectos de la divulgación se proporcionan conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2 unido a un fármaco citotóxico/citostático, por ejemplo, un fármaco que tiene actividad contra las células tumorales tanto en división como en reposo, como agentes quelantes del ADN.

Adicionalmente, se divulgan construcciones quiméricas que se expanden más allá de la quimioterapia dirigida a la inmunoterapia incorporando, por ejemplo, proporcionar anticuerpos biespecíficos que comprenden un anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2 unido a un segundo anticuerpo que es capaz de reclutar y activar componentes del sistema inmunitario o unido a un resto que es un inhibidor de punto de control (*p. ej.*, anti-CTLA4 (*p. ej.*, que comprende una región variable de ipilimumab), y/o anticuerpos dirigidos contra PD-L1 (*p. ej.*, que comprende una región variable de nivolumab o pembrolizumab) y/o anticuerpos dirigidos contra PD-L2. En determinados aspectos de la divulgación, los anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 se usan en otras plataformas que incluyen, pero sin limitación, plataformas tal como linfocitos T modificados con receptores de antígenos quiméricos (T-CAR) e inmunocitocinas.

Anticuerpos que se unen a ALPP/ALPPL2

Se descubrieron anticuerpos que se unen específicamente a ALPP y/o ALPPL2 *in vitro* e *in situ*, *p. ej.*, cuando una célula cancerosa que expresa ALPPL2 se encuentra en un microentorno tisular. Tal como se ha indicado anteriormente, dichos anticuerpos son útiles para dirigirse a cánceres cuando se usan solos o cuando se unen a un efector para formar un "efector dirigido".

Por consiguiente, en determinados aspectos de la divulgación, se proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a ALPP y/o ALPPL2 y que se une específicamente a una célula que expresa o sobreexpresa ALPPL/ALPPL2 (*p. ej.*, una célula de mesotelioma, una célula de cáncer testicular, una célula de cáncer de endometrio y determinadas células de cáncer pancreático, cáncer de ovario y cáncer de pulmón no microcítico).

Los anticuerpos designados en el presente documento como M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF (véase, *p. ej.*, la Tabla 1) son anticuerpos prototípicos ilustrativos. Anticuerpos que comprenden CDR1 de VL, CDR2 de VL, CDR3 de VL, CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de uno de estos anticuerpos se exponen en las reivindicaciones. En determinadas realizaciones se contemplan anticuerpos que comprenden el dominio VH y/o el dominio VL de uno de estos anticuerpos. También se divulgan en el presente documento anticuerpos que compiten por la unión a ALPPL y/o ALPPL2, particularmente cuando se expresan y muestran en la superficie celular, con uno o más de M25AD, M25ADX y/o M25.

Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL de anticuerpos M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC,

M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y M25wtLF se muestran en la Tabla 1.

- 5 Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL de los anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 humanos novedosos. Las regiones subrayadas representan CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. M25 y ALPPL2rd3_1 tienen cadenas pesadas idénticas pero cadenas ligeras diferentes. M25AD y ALPPL2rd3_2 tienen cadenas pesadas idénticas pero cadenas ligeras diferentes. Las SEQ ID NO se proporcionan para VH unido a VL mediante el conector indicado (*es decir*, VH-conector-VL).

10

Nombre	VH	Conector	VL	SEQ ID NO
M25AD LF	QVQLQSGGGLVAPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA FGKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQDSLRADDTAVYYCAKEG <u>DSSRWSYDLWGRTLVTVSS</u>	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPAVSVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDADYYCSSYTSSTFV <u>VFGGGTKLTVLG</u>	3
M25AD LFEG	QVQLQSGGGLVAPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA FGKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQDSLRADDTAVYYCAKEG <u>DSSRWSYDLWGRTLVTVSS</u>	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPAVSVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDADYYCSSYTSSTFV <u>VFGGGTKLTVLG</u>	4
M26AD LFDS	QVQLQSGGGLVAPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA FGKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQDSLRADDTAVYYCAKEG <u>DSSRWSYDLWGRTLVTVSS</u>	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPAVSVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDADYYCSSYTSSTFV <u>VFGGGTKLTVLG</u>	5
M25FY IA	QVQLQSGGGLVAPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA FGKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQDSLRADDTAVYYCAKEG <u>DSSRWSYDLWGRTLVTVSS</u>	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPAVSVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDADYYCSSYTIASITLV <u>VFGGGTKLTVL</u>	6
M25FY IAEF	QVQLQSGGGLVAPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA FGKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQDSLRADDTAVYYCAKEG <u>DSSRWSYDLWGRTLVTVSS</u>	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPAVSVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDADYYCSSYTIASITLV <u>VFGGGTKLTVL</u>	7
M25FY IADS	QVQLQSGGGLVAPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA FGKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQDSLRADDTAVYYCAKEG <u>DSSRWSYDLWGRTLVTVSS</u>	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPAVSVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFSGSKSGNTASLTISGL QAEDADYYCSSYTIASITLV <u>VFGGGTKLTVL</u>	8

Nombre	VH	Conector	VL	SEQ ID NO
M26	QVQLQSGGGGLVAPGGSLRL SCAASGFTFFSSYAMHWVRQA PGKLEWVAVISYDSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFCAKEG <u>DSSRWSYDLMGRTAVYSS</u>	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPAVS ~~SGSPGQSITI~~ SCTGTS ~~SDVGGIN~~ YVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSYTSTSTIN <u>VFGGGTKLTVL</u>	9
M26EG	QVQLQSGGGGLVAPGGSLRL SCAASGFTFFSSYAMHWVRQA PGKLEWVAVISYDSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFCAKEG <u>DSSRWSYDLMGRTAVYSS</u>	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPAVS ~~SGSPGQSITI~~ SCTGTS ~~SDVGGIN~~ YVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSYTSTSTIN <u>VFGGGTKLTVL</u>	10
M26DS	QVQLQSGGGGLVAPGGSLRL SCAASGFTFFSSYAMHWVRQA PGKLEWVAVISYDSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFCAKEG <u>DSSRWSYDLMGRTAVYSS</u>	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPAVS ~~SGSPGQSITI~~ SCTGTS ~~SDVGGIN~~ YVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSYTSTSTIN <u>VFGGGTKLTVL</u>	11
M26AE LF	QVQLQSGGGGLVAPGGSLRL SCAASGFTFFSSYAMHWVRQA PGKLEWVAVISYDSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFCAKEG <u>DSSRWSYDLMGRTAVYSS</u>	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPAVS ~~SGSPGQSITI~~ SCTGTS ~~SDVGGIN~~ YVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSYTSTSTIN <u>VFGGGTKLTVL</u>	12
M26AE LFEG	QVQLQSGGGGLVAPGGSLRL SCAASGFTFFSSYAMHWVRQA PGKLEWVAVISYDSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFCAKEG <u>DSSRWSYDLMGRTAVYSS</u>	GGGS GGGS GGGS	QSALTQPAVS ~~SGSPGQSITI~~ SCTGTS ~~SDVGGIN~~ YVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSYTSTSTIN <u>VFGGGTKLTVL</u>	13

Nombre	VH	Conector	VL	SEQ ID NO
M25AE LFD5	QVQLAQSGLGVKPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA PGKLEWYAVISYDGSNKYY ADSYNGRFTISRDNKRNL LQMDSLRAEDTAVYFCAREG DSSRWSYDLNGRGTLVTVSS	GGGS GGGGS GGGGS	QSALTQPSAVSSEGGQSITI SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ HFGKAPKVMYDVYTNRPSCV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSYTSTSTIV VFGGGTKEVL	14
M25AD L99P	QVQLAQSGLGVKPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA PGKLEWYAVISYDGSNKYY ADSYNGRFTISRDNKRNL LQMDSLRAEDTAVYFCAREG DSSRWSYDLNGRGTLVTVSS	GGGS GGGGS GGGGS	QSALTQPSAVSSEGGQSITI SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ HFGKAPKVMYDVYTNRPSCV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSYTSTSTIV VFGGGTKEVL	15
M25AD L99G	QVQLAQSGLGVKPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA PGKLEWYAVISYDGSNKYY ADSYNGRFTISRDNKRNL LQMDSLRAEDTAVYFCAREG DSSRWSYDLNGRGTLVTVSS	GGGS GGGGS GGGGS	QSALTQPSAVSSEGGQSITI SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ HFGKAPKVMYDVYTNRPSCV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSYTSTSTIV VFGGGTKEVL	16
M25AD S96R	QVQLAQSGLGVKPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA PGKLEWYAVISYDGSNKYY ADSYNGRFTISRDNKRNL LQMDSLRAEDTAVYFCAREG DSSRWSYDLNGRGTLVTVSS	GGGS GGGGS GGGGS	QSALTQPSAVSSEGGQSITI SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ HFGKAPKVMYDVYTNRPSCV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSYTSTSTIV VFGGGTKEVL	17
M25AD D28G	QVQLAQSGLGVKPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA PGKLEWYAVISYDGSNKYY ADSYNGRFTISRDNKRNL LQMDSLRAEDTAVYFCAREG DSSRWSYDLNGRGTLVTVSS	GGGS GGGGS GGGGS	QSALTQPSAVSSEGGQSITI SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ HFGKAPKVMYDVYTNRPSCV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSYTSTSTIV VFGGGTKEVL	18

Nombre	VH	Conector	VL	SEQ ID NO
M25AD S91G	QVQLAQSGLGKLVKPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA PGKLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMDSELRAEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLNGRGTLVTVSS</u>	GGGG GGGGS GGGGS	QSALTQPSVSVSQSPGQSITL SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ RPGKAPKVMIDVTNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSYTSTSTLV <u>VFGGGTLEIVL</u>	19
M25AD Y93H	QVQLAQSGLGKLVKPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA PGKLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMDSELRAEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLNGRGTLVTVSS</u>	GGGG GGGGS GGGGS	QSALTQPSVSVSQSPGQSITL SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ RPGKAPKVMIDVTNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSHTSTSTLV <u>VFGGGTLEIVL</u>	20
M25AD YHSRL F	QVQLAQSGLGKLVKPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA PGKLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMDSELRAEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLNGRGTLVTVSS</u>	GGGG GGGGS GGGGS	SALNQPSVSVSQSPGQSITL CTGTSSDVGGGNYVSWYQQH PGKAPKVMIDVTNRPSGV NRFGSKSGNTASLTISGLQ AEDEADYVCSSHTRTSTSTLV <u>VFGGGTLEIVL</u>	21
M25GR ITSGF YGDwl LC	QVQLAQSGLGKLVKPGGSLRL SCAASGFTFSYAMHWVRQA PGKLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMDSELRAEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLNGRGTLVTVSS</u>	GGGG GGGGS GGGGS	QSALTQPSVSVSQSPGQSITL SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ RPGKAPKVMIDVTNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSYTSTSTLV <u>VFGGGTLEIVL</u>	22
M25FS ITSGF YGDwl LC	QVQLAQSGLGKLVKPGGSLRL SCAASGFTFSYAMHWVRQA PGKLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMDSELRAEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLNGRGTLVTVSS</u>	GGGG GGGGS GGGGS	QSALTQPSVSVSQSPGQSITL SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ RPGKAPKVMIDVTNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSYTSTSTLV <u>VFGGGTLEIVL</u>	23
M2530 181A	QVQLAQSGLGKLVKPGGSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA PGKLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMDSELRAEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLNGRGTLVTVSS</u>	GGGG GGGGS GGGGS	QSALTQPSVSVSQSPGQSITL SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ RPGKAPKVMIDVTNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDEADYVCSSYTSTSTLV <u>VFGGGTLEIVL</u>	24

Nombre	VH	Conector	VL	SEQ ID NO
M2530 18LF	QVQLQSGGGGLVAPGQSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA FGKLEWVAVISYDGNKYY ADSVKGRFTISRDNSENILY LQDSLRAEEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLWGRTLTIVSS</u>	GGGGG GGGGS GGGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ HPCKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDDAAYFC ~~SAYSPPGIM~~ <u>VFGGTKLTIVLG</u>	25
M25AD	QVQLQSGGGGLVAPGQSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA FGKLEWVAVISYDGNKYY ADSVKGRFTISRDNSENILY LQDSLRAEEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLWGRTLTIVSS</u>	GGGGG GGGGS GGGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ HPCKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDDAAYFC ~~SAYSPPGIM~~ <u>VFGGTKLTIVLG</u>	26
M25AD X	QVQLQSGGGGLVAPGQSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA FGKLEWVAVISYDGNKYY ADSVKGRFTISRDNSENILS LQDSLRAEEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDPMGRGTIVTSS</u>	GGGGG GGGGS GGGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGGGNYVSWYQQ HPCKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDDAAYFC ~~SAYSPPGIM~~ <u>VFGGTKLTIVLG</u>	27
ALPPL 2r03_1	QVQLQSGGGGLVAPGQSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA FGKLEWVAVISYDGNKYY ADSVKGRFTISRDNSENILY LQDSLRAEEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLWGRTLTIVSS</u>	GGGGG GGGGS GGGGS	QSALTQPASVSGSPGQSITI SCTGTSSDVGGGKYVSWYQQ HPCKAPKLMIEVSNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDDAAYFC ~~SAYSPPGIM~~ <u>FGGGTKLTIVLG</u>	28
ALPPL 2r03_2	QVQLQSGGGGLVAPGQSLRL SCAASGFTFSYDMHWVRQA FGKLEWVAVISYDGNKYY ADSVKGRFTISRDNSENILY LQDSLRAEEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLWGRTLTIVSS</u>	GGGGG GGGGS GGGGS	QSALTQPASVSGSEFGQSITI SCTGTSSDVGGHYVSWYQQ HPCKAPKLMIEVSNRPSGV SNRFGSKSGNTASLTISGL QAEDDAAYFC ~~SAYSPPGIM~~ <u>FGGGTKLTIVLG</u>	29

Nombre	VH	Conector	VL	SEQ ID NO
M25AG 1A	QVQLQSGGGLVRFGGSLRL SCAASGFTFSYSGMHVRQA FGKLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQDSLRADDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLNGRGTLYVSS</u>	GGGGG GGGGG GGGGG	QSALTQPAVSQSPGQSITI SCTGTSDDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFGSGSKGNTASLTISGL QAEDADYTCSSYTTASTLV <u>VFGGGTKLEVL</u>	30
M25AG 1F	QVQLQSGGGLVRFGGSLRL SCAASGFTFSYSGMHVRQA FGKLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQDSLRADDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLNGRGTLYVSS</u>	GGGGG GGGGG GGGGG	QSALTQPAVSQSPGQSITI SCTGTSDDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFGSGSKGNTASLTISGL QAEDADYTCSSYTTASTLV <u>VFGGGTKLEVL</u>	31
M25AS 1A	QVQLQSGGGLVRFGGSLRL SCAASGFTFSYSGMHVRQA FGKLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQDSLRADDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLNGRGTLYVSS</u>	GGGGG GGGGG GGGGG	QSALTQPAVSQSPGQSITI SCTGTSDDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFGSGSKGNTASLTISGL QAEDADYTCSSYTTASTLV <u>VFGGGTKLEVL</u>	32
M25AS 1F	QVQLQSGGGLVRFGGSLRL SCAASGFTFSYSGMHVRQA FGKLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQDSLRADDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLNGRGTLYVSS</u>	GGGGG GGGGG GGGGG	QSALTQPAVSQSPGQSITI SCTGTSDDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFGSGSKGNTASLTISGL QAEDADYTCSSYTTASTLV <u>VFGGGTKLEVL</u>	33
M25AS w1	QVQLQSGGGLVRFGGSLRL SCAASGFTFSYSGMHVRQA FGKLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQDSLRADDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLNGRGTLYVSS</u>	GGGGG GGGGG GGGGG	QSALTQPAVSQSPGQSITI SCTGTSDDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFGSGSKGNTASLTISGL QAEDADYTCSSYTTASTLV <u>VFGGGTKLEVL</u>	34
M25AV 1A	QVQLQSGGGLVRFGGSLRL SCAASGFTFSYSGMHVRQA FGKLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNKNTLY LQDSLRADDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLNGRGTLYVSS</u>	GGGGG GGGGG GGGGG	QSALTQPAVSQSPGQSITI SCTGTSDDVGGYNYVSWYQQ HPGKAPKVMYIDVTNRPSGV SNRFGSGSKGNTASLTISGL QAEDADYTCSSYTTASTLV <u>VFGGGTKLEVL</u>	35

Nombre	VH	Conector	VL	SEQ ID NO
M25AV LF	QVQLQQSGGGLVRFPGGSLRL SCAASGFTFSYAMHWVRQA PKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNSEKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLWGCGTLYTVSS</u>	GGGGS GGGGS GGGGS	QSALTQFASVSSSEFGQSITI SCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ HEGKAFKVMYDVITNRPSSGV SNRFSGSKSNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>VFGGCTKLTVLG</u>	36
M25AL IA	QVQLQQSGGGLVRFPGGSLRL SCAASGFTFSYAMHWVRQA PKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNSEKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLWGCGTLYTVSS</u>	GGGGS GGGGS GGGGS	QSALTQFASVSSSEFGQSITI SCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ HEGKAFKVMYDVITNRPSSGV SNRFSGSKSNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>VFGGCTKLTVLG</u>	37
M25AL LF	QVQLQQSGGGLVRFPGGSLRL SCAASGFTFSYAMHWVRQA PKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNSEKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLWGCGTLYTVSS</u>	GGGGS GGGGS GGGGS	QSALTQFASVSSSEFGQSITI SCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ HEGKAFKVMYDVITNRPSSGV SNRFSGSKSNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>VFGGCTKLTVLG</u>	38
M25wt IA	QVQLQQSGGGLVRFPGGSLRL SCAASGFTFSYAMHWVRQA PKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNSEKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLWGCGTLYTVSS</u>	GGGGS GGGGS GGGGS	QSALTQFASVSSSEFGQSITI SCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ HEGKAFKVMYDVITNRPSSGV SNRFSGSKSNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>VFGGCTKLTVLG</u>	39
M25wt LF	QVQLQQSGGGLVRFPGGSLRL SCAASGFTFSYAMHWVRQA PKGLEWVAVISYDGSNKYY ADSVKGRFTISRDNSEKNTLY LQMDSLRAEDTAVYFCAREG <u>DSSRWSYDLWGCGTLYTVSS</u>	GGGGS GGGGS GGGGS	QSALTQFASVSSSEFGQSITI SCTGTSSDVGGYNYVSWYQQ HEGKAFKVMYDVITNRPSSGV SNRFSGSKSNTASLTISGL QAEDEADYYC <u>SSYTSTSTFV</u> <u>VFGGCTKLTVLG</u>	40

Usando las secuencias de aminoácidos proporcionadas para los anticuerpos M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y M25wtLF, pueden prepararse numerosas formas de anticuerpos, *p. ej.*, tal como se describe más adelante. Tales formas incluyen, pero no se limitan a una inmunoglobulina sustancialmente intacta (*p. ej.*, de longitud completa) (*p. ej.*, una IgA, IgE, IgG y similares), un fragmento de anticuerpo (*p. ej.*, Fv, Fab, (Fab')₂, (Fab')₃, IgGΔCH₂, un minicuerpo y similares), un anticuerpo de cadena sencilla (*p. ej.*, scFv), un diacuerpo, un unicuerpo, un aficuerpo y similares.

Se reconocerá, que en determinadas realizaciones, *p. ej.*, donde los anticuerpos son anticuerpos de cadena sencilla, los dominios VH y VL que comprenden dicho anticuerpo pueden unirse directamente entre sí o mediante un conector peptídico. Los conectores peptídicos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a GGGGS GGGGS GGGGS (SEQ ID NO:41), GGGGS GGGGS (SEQ ID NO:42), GGGGS (SEQ ID NO:43), GS GGGGS GGGGS GGS GGGGS (SEQ ID NO:44), SGGGS (SEQ ID NO:45), GGS (SEQ ID NO:46), VPGV (SEQ ID NO:47), VPGVG (SEQ ID NO:48), GVPVG (SEQ ID NO:49), GVG VP GVG (SEQ ID NO:50), VP GVG VP GVG (SEQ ID NO:51), GGSSRSS (SEQ ID NO:52) y GGSSRSSSGGGSGGGG (SEQ ID NO:53) y similares.

Tal como se ha indicado anteriormente, el anticuerpo expuesto en las reivindicaciones se une específicamente a ALPPL2 (véase, *p. ej.*, la Figura 1 para las secuencias de ALPP y ALPPL2). Normalmente, los anticuerpos contemplados en el presente documento se unirán específicamente a células cancerosas que expresan ALPPL2 o un dominio del mismo que está unido por los anticuerpos M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une a células que expresan ALPPL2 con una afinidad mayor que (K_D menos de) aproximadamente 5 nM, o menos de aproximadamente 4 nM, o menos de aproximadamente 3 nM, o aproximadamente 2 nM o menos cuando se mide en células vivas mediante FACS. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une a células que expresan ALPPL2 con una afinidad mayor que (K_D menos de) aproximadamente 50 pM, o menos de aproximadamente 40 pM, o menos de aproximadamente 30 pM cuando se mide en células vivas mediante FACS.

Usando la información de secuencia proporcionada en el presente documento, los anticuerpos que comprenden una o más de las CDR que comprenden, *p. ej.*, M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF, o anticuerpos que comprenden el (los) dominio(s) VH y/o VL de estos anticuerpos se pueden preparar fácilmente usando métodos estándar (por ejemplo, métodos de síntesis química y/o métodos de expresión recombinante) bien conocidos por los expertos en la técnica, *p. ej.*, tal como se describe más adelante,

Además, se pueden identificar otros anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 "relacionados" mediante la detección de anticuerpos que se unen al mismo epítipo (*p. ej.*, que compiten con uno o más de los anticuerpos M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF para unirse a ALPP y/o ALPPL2 y/o a una célula que expresa o sobreexpresa ALPP y/o ALPPL2, y/o mediante modificación de los anticuerpos M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF identificados en el presente documento para producir bibliotecas de anticuerpos modificados y luego volver a seleccionar los anticuerpos en la biblioteca para mejorar la unión a células que expresan o sobreexpresan ALPP y/o ALPPL2 o un dominio de los mismos.

Identificación de otros anticuerpos que se unen al mismo (a los mismos) epítipo(s) de ALPP y/o ALPPL2 que M25AD, M25ADX y/o M25.

Habiendo identificado ALPP y/o ALPP2 como diana(s) de anticuerpos útiles y anticuerpos M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1,

ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF como anticuerpos prototípicos útiles, otros anticuerpos "relacionados" que se unen a ALPP y/o ALPPL2 pueden identificarse fácilmente mediante la detección de anticuerpos que se unen a ALPP/ALPPL2 y que reaccionan de forma cruzada con uno o más de M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF, *p. ej.*, en el epítipo unido por M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF, y/o para anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con uno o más de M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF para unirse a células de mesotelioma (*p. ej.*, línea celular M28),

Anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos monoclonales que se unen a ALPP y/o ALPPL2, preferiblemente que se unen el epítipo unido por uno o más de M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF se pueden producir usando una variedad de técnicas conocidas, como la técnica estándar de hibridación de células somáticas descrita por Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495, transformación viral u oncogénica de linfocitos B o técnica de presentación en fagos utilizando bibliotecas de genes de anticuerpos humanos. En realizaciones particulares, los anticuerpos son anticuerpos monoclonales completamente humanos.

Por consiguiente, en el presente documento se divulga un método de hibridoma para producir un anticuerpo que se une a ALPP y/o ALPPL2. En este método, se puede inmunizar un ratón u otro animal hospedador apropiado con un antígeno adecuado para provocar linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al antígeno usado para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Luego, los linfocitos se pueden fusionar con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press)). Se analiza el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma para determinar la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Después de identificarse las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución límite y cultivarse por procedimientos convencionales (*Id.*). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de líquido ascítico en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden separar del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-sefrosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

También divulgado en el presente documento, los anticuerpos y porciones de anticuerpos que se unen a ALPP y/o ALPPL2 se pueden aislar a partir de bibliotecas de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en, por ejemplo, McCafferty y col. (1990) Nature, 348: 552-554, Clackson y col. (1991) Nature, 352:624-628, Marks y col. (1991) J. Mol. Biol., 222: 581-597, Hoet y col (2005) Nature Biotechnol., 23: 344-348; patentes de los EE.UU. n.º 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 concedida a Ladner y col.; patentes de los EE.UU. n.º 5.427.908 y 5.580.717 concedida a Dower y col.; patentes de los EE.UU. n.º 5.969.108 y 6.172.197 concedida a McCafferty y col.; y patentes de los EE.UU. n.º 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 concedida a Griffiths y col. Adicionalmente, la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks y col. (1992) Bio/Technology, 10:779-783), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse y col. (1993) Nucl. Acids. Res., 21: 2265-2266) también se puede utilizar.

En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo monoclonal o la porción de unión a antígeno del mismo que se une a ALPP y/o ALPPL2, preferiblemente que se une al epítipo unido por uno o más de M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1,

ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF se produce utilizando la técnica de presentación en fagos descrita por Hoet y col., anteriormente citado. Esta técnica implica la generación de una biblioteca de Fab humanos que tiene una combinación única de secuencias de inmunoglobulinas aisladas de donantes humanos y que tiene diversidad sintética en las CDR de cadena pesada. Luego se analiza la biblioteca en busca de Fab que se unan a ALPP y/o ALPPL2, preferiblemente compitiendo por la unión con uno o más de M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF.

En otro aspecto más de la divulgación, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra ALPP y/o ALPPL2, preferiblemente que comprenden el epítipo unido por uno o más de M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema del ratón (véase, *p. ej.*, Lonberg, y col. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Lonberg y Huszar, (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, Harding y Lonberg (1995) *Ann. NY. Acad. Sci.* 764: 536-546, y patentes de los EE.UU. n.º 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; todas concedidas a Lonberg y Kay; patente de los EE.UU. n.º 5.545.807 concedida a Surani y col.; publicación PCT n.º WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas concedidas a Lonberg y Kay; y publicación PCT n.º WO 01/14424 concedida a Korman y col.).

En otro aspecto de la divulgación, los anticuerpos humanos dirigidos contra ALPP y/o ALPPL2 que se unen preferiblemente al epítipo unido por uno o más de M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF pueden generarse utilizando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana (véase, *p. ej.*, publicación PCT WO 02/43478 concedida a Ishida y col.).

En la técnica están disponibles sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para generar anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 de la divulgación. Por ejemplo, se puede utilizar un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); tales ratones se escriben en, por ejemplo, patentes de los EE.UU. n.º 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 concedida a Kucherlapati y col.

En la técnica están disponibles sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana y pueden usarse para generar anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 contemplados en el presente documento. Por ejemplo, se pueden utilizar ratones que portan tanto un transcromosoma de cadena pesada humana como un transcromosoma de cadena ligera humana; como se describe en Tomizuka y col. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 722-727. Además, En la técnica se han descrito vacas que portan transcromosomas de cadenas pesadas y ligeras humanas (véase, *p. ej.*, Kuroiwa y col. (2002) *Nature Biotechnology* 20: 889-894) y pueden usarse para generar anticuerpos anti-ALPP y/o ALPPL2.

En otro aspecto más de la divulgación, los anticuerpos que se unen específicamente a ALPP y/o ALPPL2, preferiblemente que se unen al epítipo unido por uno o más de M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF se pueden preparar usando una planta transgénica y/o células vegetales cultivadas (tales como, por ejemplo, tabaco, maíz y lenteja de agua) que producen tales anticuerpos. Por ejemplo, se pueden usar hojas de tabaco transgénicas que expresan anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos para producir tales anticuerpos mediante, por ejemplo, usando un promotor inducible (véase, *p. ej.*, Cramer y col. (1999) *Curr. Top. Microbol. Immunol.* 240: 95-118). Además, se puede utilizar maíz transgénico para expresar tales anticuerpos y sus porciones de unión a antígeno (véase, *p. ej.*, Hood y col. (1999) *Adv. Exp. Med. Biol.* 464: 127-147). Los anticuerpos también se pueden producir en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas, incluidas porciones de anticuerpos, tal como anticuerpos de cadena sencilla (scFv), por ejemplo, usando semillas de tabaco y tubérculos de patata (véase, *p. ej.*, Conrad y col. (1998) *Plant Mol. Biol.* 38: 101-109). Los métodos para producir anticuerpos o porciones de unión a antígeno en plantas también se pueden encontrar en, *p. ej.*, Fischer y col. (1999) *Biotechnol. ALPP. Biochem.* 30: 99-108, Ma y col. (1995) *Trends Biotechnol.* 13: 522-527, Ma y col. (1995) *Plant Physiol.* 109: 341-346; Whitelam y col. (1994) *Biochem. Soc. Trans.* 22: 940-944, y patentes de los EE.UU. n.º 6.040.498 y 6.815.184.

La especificidad de unión de anticuerpos monoclonales o porciones de los mismos que se unen a ALPP y/o ALPPL2, preferiblemente que se unen el epítipo unido por uno o más de M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF se pueden preparar usando cualquier técnica, incluidas las descritas en este caso, pueden determinarse mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal o porción del mismo también puede determinarse mediante el análisis de Scatchard de Munson y col. (1980) Anal. Biochem., 107:220.

Reactividad cruzada con M25AD, M25ADX, M25, ALPPL2rd3 1, ALPPL2rd3 2, M25AG, M25AS, M25AV y/o M25AL.

En otro enfoque, los anticuerpos que se unen a ALPP y/o ALPPL2 pueden identificarse por el hecho de que se unen al mismo epítipo que los anticuerpos "prototípicos" descritos en el presente documento (*p. ej.*, M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF). Para identificar tales anticuerpos, no es necesario aislar el epítipo sujeto. En determinados aspectos de la divulgación, se pueden analizar, *p. ej.*, bibliotecas de anticuerpos para detectar anticuerpos que compiten con los anticuerpos prototípicos de esta divulgación por la unión mediante una célula que expresa ALPP/ALPP2 (*p. ej.*, células de mesotelioma como M28, *etc.*), y/o para unirse a ALPP/ALPPL2.

Los expertos en la técnica conocen bien los métodos de selección de bibliotecas para determinar la unión de epítopos y/o la unión y/o internalización de células. En determinados aspectos de la divulgación, los anticuerpos anti-ALPP y/o ALPPL2 con reacción cruzada muestran al menos un 60 %, preferiblemente un 80 %, más preferiblemente un 90 %, y lo más preferiblemente al menos un 95 % o al menos un 99 % de reactividad cruzada con uno o más de los anticuerpos M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF descritos en el presente documento.

Métodos de presentación en fagos para seleccionar otros anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 "relacionados".

Usando las secuencias conocidas para los anticuerpos M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF, se puede utilizar una variedad de métodos de presentación en fagos (o presentación en levaduras) para generar otros anticuerpos que se unen específicamente a ALPP/ALPPL2, preferiblemente que se unen el epítipo unido por M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF con la misma o incluso mayor afinidad.

Métodos de intercambio de cadenas.

Un enfoque para crear variantes de anticuerpos ha sido reemplazar el gen de V_H o V_L original por un repertorio de genes de V para crear nuevos asociados (intercambio de cadenas) (Clackson y col. (1991) Nature. 352: 624-628) en una biblioteca de presentación en fagos o de presentación en levaduras. Usando el intercambio de cadenas y presentación en fagos, la afinidad de un fragmento de anticuerpo scFv humano que se une al hapteno feniloxazolona (phOx) aumentó de 300 nM a 1 nM (300 veces) (Marcas y col. (1992) Bio/Technology 10: 779-783).

Por lo tanto, por ejemplo, para alterar la afinidad de un anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2 descrito en el presente documento, se puede crear un repertorio de genes de scFv mutantes que contengan un gen de V_H de los anticuerpos prototípicos M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF y un repertorio de genes de V_L humanos (intercambio de cadenas ligeras). El repertorio de genes de scFv se puede clonar en un vector de presentación en fagos, *p. ej.*, pHEN-1 (Hoogenboom

y col. (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19: 4133-4137) u otros vectores, y después de la transformación se obtiene una biblioteca de transformantes.

Análogamente, para intercambiar cadenas pesadas, se puede crear un repertorio de genes de scFv mutantes que contengan un gen de V_L de los anticuerpos prototípicos M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF y un repertorio de genes de V_H humanos (intercambio de cadenas pesadas). El repertorio de genes de scFv se puede clonar en un vector de presentación en fagos, *p. ej.*, pHEN-1 (Hoogenboom y col. (1991) *Nucleic Acids Res.*, 19: 4133-4137) u otros vectores, y después de la transformación se obtiene una biblioteca de transformantes.

Las bibliotecas resultantes se pueden comparar con la diana relevante (*p. ej.*, ALPP/ALPPL2, células que expresan ALPP/ALPPL2) y/o para determinar la reactividad cruzada con M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF.

Mutagénesis dirigida al sitio para mejorar la afinidad de unión.

La mayoría de las cadenas laterales de aminoácidos que entran en contacto con el antígeno se encuentran normalmente en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), tres en la V_H (CDR1, CDR2 y CDR3) y tres en la V_L (CDR1, CDR2 y CDR3) (Chothia y col. (1987) *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917; Chothia y col. (1986) *Science*, 233: 755-8; Nhan y col. (1991) *J. Mol. Biol.*, 217: 133-151). Estos residuos aportan la mayoría de la energía de unión responsable de la afinidad del anticuerpo por el antígeno. En otras moléculas, se ha demostrado que la mutación de aminoácidos que entran en contacto con el ligando es un medio eficaz para aumentar la afinidad de una molécula de proteína por su asociado de unión (Lowman y col. (1993) *J. Mol. Biol.*, 234: 564-578; Wells (1990) *Biochemistry*, 29: 8509-8516). La mutagénesis dirigida al sitio de las CDR y la detección contra células/líneas celulares que expresan ALPP/ALPPL2, por ejemplo como se describe en el presente documento puede producir anticuerpos que tienen una afinidad de unión mejorada.

Aleatorización de CDR para producir scFv humano de mayor afinidad.

En una extensión de la mutagénesis simple dirigida al sitio, se pueden crear bibliotecas de anticuerpos mutantes donde las CDR parciales o completas se aleatorizan (CDR1 CDR2 y/o CDR3 de V_L y/o CDR1, CDR2 y/o CDR3 de V_H). En un aspecto de la divulgación, cada CDR se aleatoriza en una biblioteca separada, utilizando un anticuerpo conocido (*p. ej.*, M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF) como plantilla. Las secuencias de CDR de los mutantes de mayor afinidad de cada biblioteca de CDR se combinan para obtener un aumento aditivo de la afinidad. Se ha utilizado un enfoque similar para aumentar la afinidad de la hormona del crecimiento humana (hGH) por el receptor de la hormona del crecimiento más de 1500 veces desde $3,4 \times 10^{-10}$ hasta $9,0 \times 10^{-13}$ M (Lowman y col. (1993) *J. Mol. Biol.*, 234: 564-578).

CDR3 de V_H a menudo ocupa el centro de la bolsa de unión y, por lo tanto, es probable que las mutaciones en esta región den como resultado un aumento de la afinidad (Clackson y col. (1995) *Science*, 267: 383-386). En un aspecto de la divulgación, los residuos de CDR3 de V_H se aleatorizan (véase, *p. ej.*, Schier y col. (1996) *Gene*, 169: 147-155; Schier y Marks (1996) *Human Antibodies and Hybridomas*, 7: 97-105, 1996; y Schier y col. (1996) *J. Mol. Biol.* 263: 551-567).

Otras modificaciones de anticuerpos.

En un aspecto de la divulgación, secuencias parciales de anticuerpos derivadas de los anticuerpos M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF se pueden usar para producir anticuerpos estructural y funcionalmente relacionados. Por ejemplo, los anticuerpos interaccionan con antígenos diana de manera predominante a través de los restos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos en las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Dado que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de

las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos de origen natural construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo específico de origen natural insertadas en las secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, *p. ej.*, Riechmann y col. (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones et al., (1986) *Nature* 321: 522-525; y Queen y col. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 10029-10033). Tales secuencias marco se pueden obtener a partir de bases de datos públicas de ADN que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de la línea germinal.

Por lo tanto, una o más características estructurales de un anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2, como las CDR, se pueden utilizar para crear anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 estructuralmente relacionados que retengan al menos una propiedad funcional de, por ejemplo, los anticuerpos M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF, *p. ej.*, unión a células tumorales que expresan ALPPL2.

En un aspecto particular de la divulgación, una o más regiones CDR de M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF (*p. ej.*, CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de VH y/o CDR1 y/o CDR2 y/o CDR3 de VL) se combinan de forma recombinante con regiones de marco humanas conocidas y CDR para crear anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 adicionales, modificados de manera recombinante. Las regiones de marco variables de cadena pesada y ligera se pueden derivar de la misma o diferentes secuencias de anticuerpo.

Es bien conocido en la técnica que los dominios CDR3 de cadena pesada y ligera de anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno (véase, *p. ej.*, Hall y col. (1992) *J. Immunol.*, 149: 1605-1612; Polymenis y col. (1994) *J. Immunol.*, 152: 5318-5329; Jahn y col. (1995) *Immunobiol.*, 193:400-419; Klimka y col. (2000) *Brit. J. Cancer*, 83: 252-260; Beiboer y col. (2000) *J. Mol. Biol.*, 296: 833-849; Rader y col. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 8910-8915; Barbas y col. (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 2161-2162; Ditzel y col. (1996) *J. Immunol.*, 157: 739-749). Por consiguiente, en determinados aspectos de la divulgación, se generan anticuerpos que incluyen las CDR3 de cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos particulares descritos en el presente documento (*p. ej.*, M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF). Por consiguiente, en determinados aspectos de la divulgación, se generan anticuerpos que incluyen las CDR1 de cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos particulares descritos en el presente documento (*p. ej.*, M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF). Los anticuerpos pueden incluir además las otras CDR de cadena pesada y/o ligera de los anticuerpos de la presente divulgación (*p. ej.*, M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF).

En determinados aspectos de la divulgación, las regiones CDR1, 2 y/o 3 de los anticuerpos modificados anteriormente descritos pueden comprender la(s) secuencia(s) de aminoácidos exacta(s) como las divulgadas en el presente documento (*p. ej.*, CDR de M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF). Sin embargo, el experto habitual en la técnica apreciará que puede ser posible cierta desviación de las secuencias de CDR exactas manteniendo al mismo tiempo la capacidad del anticuerpo para unirse a ALPP y/o ALPPL2 de forma eficaz (*p. ej.*, sustituciones conservativas de aminoácidos). Por consiguiente, en otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo modificado puede estar compuesto por una o más CDR que son, por ejemplo, un 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o un 99,5 % idénticas a uno o más CDR de los anticuerpos M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF,

M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF.

En otro aspecto de la divulgación, se pueden alterar uno o más residuos de una CDR para modificar la unión para lograr una tasa de unión más favorecida. Usando esta estrategia, puede conseguirse un anticuerpo que tiene una afinidad de unión ultraalta de, por ejemplo, 10^{10} M^{-1} o más. Las técnicas de maduración de afinidad, bien conocidas en la técnica y aquellas descritas en el presente documento, se pueden utilizar para alterar la(s) región(es) CDR seguido de la selección de las moléculas de unión resultantes para detectar el cambio deseado en la unión. Por consiguiente, a medida que se alteran la(s) CDR(s), los cambios en la afinidad de unión así como la inmunogenicidad se pueden monitorear y clasificar de manera que se logren un anticuerpo optimizado para la mejor unión combinada y una baja inmunogenicidad.

Además de, o en lugar de, las modificaciones dentro de las CDR, también se pueden realizar modificaciones dentro de una o más de las regiones de marco, FR1, FR2, FR3 y FR4, de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo, siempre que estas modificaciones no eliminen la afinidad de unión del anticuerpo.

En otro aspecto de la divulgación, el anticuerpo se modifica adicionalmente con respecto a la función efectora, para mejorar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer, por ejemplo. Por ejemplo, pueden introducirse restos de cisteína en la región Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercadena en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una destrucción de células mediada por complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC) aumentadas (véase, *p. ej.*, Caron y col. (1992) J. Exp. Med. 176: 1191-1195; Shopes (1992) J. Immunol. 148: 2918-2922). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con una actividad antitumoral mejorada usando reticuladores heterobifuncionales (véase, *p. ej.*, Wolff y col. (1993) Cancer Res. 53:2560-2565). Como alternativa, se puede modificar por ingeniería genética un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y, por lo tanto, puede tener una lisis de completo aumentada y capacidades de ADCC (véase, *p. ej.*, Stevenson y col. (1989) Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230).

En algunos casos, los residuos de la región de marco (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no humanos correspondientes. En determinados aspectos de la divulgación, el anticuerpo puede incluir residuos que no se encuentran ni en un marco humano ni en un marco no humano, pero se incluyen para refinar y optimizar aún más el rendimiento de los anticuerpos. En determinados aspectos de la divulgación, los anticuerpos pueden tener regiones Fc modificadas como se describe en publicación internacional PCT n.º WO 99/58572.

Producción de anticuerpos.

En diversos aspectos de la divulgación, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden producirse mediante síntesis química o pueden expresarse de forma recombinante.

Síntesis química.

Utilizando la información de secuencia proporcionada en el presente documento, los anticuerpos específicos anti-ALPPL2 descritos en el presente documento (*p. ej.*, M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF) o variantes de los mismos, se pueden sintetizar químicamente utilizando métodos bien conocidos de síntesis de péptidos. La síntesis en fase sólida en la que el aminoácido C-terminal de la secuencia se une a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia es un método preferido para la síntesis química de anticuerpos de cadena sencilla. Las técnicas para la síntesis en fase sólida se describen en Barany y Merrifield, Solid Phase Peptide Synthesis; págs. 3-284 en The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, parte A., Merrifield y col. (1963) J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156, y Stewart y col. (1984) Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill.

Expresión recombinante de anticuerpos anti-ALPPL2/ALPPL.

En determinados aspectos de la divulgación, los anticuerpos específicos anti-ALPPL2/ALPPL descritos en el presente documento (*p. ej.*, M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF) o variantes de los mismos, se expresan de forma recombinante utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, usando la información de secuencia del M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt,

M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF proporcionada en el presente documento, los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo deseado se pueden preparar de acuerdo con varios métodos estándar conocidos por los expertos en la materia. Los ácidos nucleicos se transfectan en células huésped que luego expresan el anticuerpo deseado o una cadena del mismo.

Las técnicas de clonación molecular para lograr estos fines se conocen en la técnica. Una amplia variedad de métodos de clonación y de amplificación *in vitro* son adecuados para la construcción de ácidos nucleicos recombinantes. Ejemplos de estas técnicas e instrucciones suficientes para dirigir a personas expertas a través de muchos ejercicios de clonación se encuentran en Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volumen 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2ª ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook); y Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel y col., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (Suplemento de 1994) (Ausubel). Los métodos de producción de inmunoglobulinas recombinantes también se conocen en la materia. Véase, Cabilly, patente de los EE.UU. n.º 4.816.567; y Queen y col. (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 86: 10029-10033. Además, también se proporcionan protocolos detallados para la expresión de anticuerpos en Liu y col. (2004) Cancer Res. 64: 704-710, Poul y col. (2000) J. Mol. Biol. 301: 1149-1161, y similares.

Creación de otras formas de anticuerpos.

Utilizando las secuencias conocidas y/o identificadas (*p. ej.* secuencias de V_H y/o V_L) de los anticuerpos de cadena sencilla proporcionados en el presente documento se pueden crear fácilmente otras formas de anticuerpos. Tales formas incluyen, pero sin limitación, anticuerpos multivalentes, anticuerpos completos, scFv, (scFv)₂, Fab, (Fab)₂, anticuerpos quiméricos, y similares.

Creación de homodímeros.

Por ejemplo, para crear anticuerpos de (scFv')₂, se unen dos anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2, ya sea a través de un conector (*p. ej.*, un conector de carbono, un péptido, *etc.*) o a través de un enlace disulfuro entre, por ejemplo, dos cisteínas. Por lo tanto, por ejemplo, para crear scFv unidos por disulfuro, se puede introducir un residuo de cisteína mediante mutagénesis dirigida al sitio en el extremo carboxi terminal de los anticuerpos descritos en el presente documento.

Se puede expresar un scFv a partir de esta construcción, purificarse por IMAC, y analizarse por filtración en gel. Para producir dímeros (scFv')₂, la cisteína se reduce mediante incubación con 3-mercaptopetanol 1 mM y la mitad del scFv se bloquea mediante la adición de DTNB. Los scFv bloqueados y desbloqueados se incuban juntos para formar (scFv')₂ y el material resultante se puede analizar mediante filtración en gel. La afinidad del dímero resultante se puede determinar utilizando métodos estándar, *p. ej.* por BIAcore.

En un aspecto ilustrativo de la divulgación, el dímero (scFv')₂ se crea uniendo los fragmentos scFv' a través de un conector, *p. ej.*, a través de un conector peptídico. Esto puede conseguirse por una diversidad de medios conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, un enfoque se describe por Holliger y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (*véase también* WO 94/13804).

Se observa que utilizando las secuencias de V_H y/o V_L proporcionadas en el presente documento Fabs y dímeros (Fab')₂ también se pueden preparar fácilmente. Fab es una cadena ligera unida a V_H -C_H1 mediante un enlace disulfuro y puede crearse fácilmente usando métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica. La F(ab)₂ se puede producir dimerizando el Fab, *p. ej.*, como se describió anteriormente para el dímero (scFv')₂.

Anticuerpos quiméricos.

Los anticuerpos contemplados en el presente documento también incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntico u homólogo a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo concreta, mientras que el resto de las cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (*véase, p. ej.*, patente de los EE.UU. n.º 4.816.567; Morrison y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 6851-6855, *etc.*).

Si bien los anticuerpos prototípicos proporcionados en el presente documento (*p. ej.*, M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF) son anticuerpos completamente humanos, se contemplan anticuerpos quiméricos, particularmente cuando dichos anticuerpos se van a utilizar en especies distintas de los humanos (*p. ej.*, en

aplicaciones veterinarias). Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos que comprenden porciones de dos especies diferentes (*p. ej.*, una porción humana y otra no humana). Normalmente, la región de combinación de antígeno (o región variable) de un anticuerpo quimérico se deriva de una fuente de una especie y la región constante del anticuerpo quimérico (que confiere función efectora biológica a la inmunoglobulina) se deriva de otra fuente. Los expertos en la materia conocen bien un gran número de métodos para generar anticuerpos quiméricos (*véase, p. ej.*, patentes de los EE.UU. n.º: 5.502.167, 5.500.362, 5.491.088, 5.482.856, 5.472.693, 5.354.847, 5.292.867, 5.231.026, 5.204.244, 5.202.238, 5.169.939, 5.081.235, 5.075.431, y 4.975.369, y solicitud PCT WO 91/0996).

En general, los procedimientos utilizados para producir anticuerpos quiméricos consisten en las siguientes etapas (el orden de algunas etapas puede intercambiarse): (a) identificar y clonar el segmento genético correcto que codifica la porción de unión al antígeno de la molécula de anticuerpo; este segmento genético (conocido como las regiones de diversidad y unión, variables VDJ, variable para cadenas pesadas o regiones de unión, variables VJ para cadenas ligeras, o simplemente como la V o región variable o regiones V_H y V_L) pueden estar en forma de ADNc o genómica; (b) clonar los segmentos génicos que codifican la región constante humana o parte deseada de la misma; (c) ligar la región variable a la región constante de modo que el anticuerpo quimérico completo esté codificado en una forma transcribible y traducible; (d) ligar esta construcción en un vector que contiene un marcador seleccionable y regiones de control de genes tales como promotores, potenciadores y señales de adición de poli(A); (e) amplificar esta construcción en una célula hospedadora (*p. ej.*, bacterias); (f) introducir el ADN en células eucariotas (transfección), con mayor frecuencia en linfocitos de mamíferos; y cultivar la célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo quimérico.

Estos protocolos han manipulado anticuerpos con varias especificidades de unión a antígeno distintas para producir proteínas quiméricas (*p. ej.*, anti-TNP: Boulianne y col. (1984) *Nature*, 312: 643) y antígenos antitumorales (*véase, p. ej.*, Sahagan y col. (1986) *J. Immunol.*, 137: 1066). Asimismo, se han logrado varias funciones efectoras diferentes uniendo nuevas secuencias a aquellas que codifican la región de unión a antígeno. Algunas de estas incluyen enzimas (Neuberger y col. (1984) *Nature* 312: 604), regiones constantes de inmunoglobulina de otra especie y regiones constantes de otra cadena de inmunoglobulina (Sharon y col. (1984) *Nature* 309: 364; Tan y col., (1985) *J. Immunol.* 135: 3565-3567).

En determinados aspectos de la divulgación, se utiliza un vector de ADN recombinante para transfectar una línea celular que produce un anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2 (*p. ej.*, M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF). El vector de ADN recombinante novedoso contiene un "gen de reemplazo" para reemplazar todo o una porción del gen que codifica la región constante de inmunoglobulina en la línea celular (*p. ej.*, un gen de reemplazo puede codificar toda o una porción de una región constante de una inmunoglobulina humana, una clase específica de inmunoglobulina, o una enzima, una toxina, un péptido biológicamente activo, un factor de crecimiento, inhibidor o un péptido conector para facilitar la conjugación con un fármaco, toxina u otra molécula, *etc.*), y una "secuencia diana" que permite la recombinación homóloga dirigida con secuencias de inmunoglobulina dentro de la célula productora de anticuerpos.

En otro aspecto de la divulgación, se usa un vector de ADN recombinante para transfectar una línea celular que produce un anticuerpo que tiene una función efectora deseada, (*p. ej.*, una región constante de una inmunoglobulina humana) en cuyo caso, el gen de reemplazo contenido en el vector recombinante puede codificar toda o una porción de una región de un anticuerpo específico de ALPPL2/ALPP y la secuencia diana contenida en el vector recombinante permite la recombinación homóloga y la modificación genética dirigida dentro de la célula productora de anticuerpos. En cualquier caso, cuando solo se reemplaza una porción de la región variable o constante, el anticuerpo quimérico resultante puede definir el mismo antígeno y/o tener la misma función efectora pero puede alterarse o mejorarse de modo que el anticuerpo quimérico pueda demostrar una mayor especificidad de antígeno, constante de unión de mayor afinidad, aumento de la función efectora, o aumento de la secreción y producción por parte de la línea celular productora de anticuerpos transfectada, *etc.*

Independientemente de la realización practicada, los procesos de selección de ADN integrado (a través de un marcador seleccionable), detección de producción de anticuerpos quiméricos y clonación de células, se puede utilizar para obtener un clon de células que producen el anticuerpo quimérico.

Por lo tanto, un fragmento de ADN que codifica una modificación de un anticuerpo monoclonal puede dirigirse directamente al sitio del gen de inmunoglobulina expresado dentro de una línea celular de linfocitos B o de hibridoma. Se pueden realizar construcciones de ADN para cualquier modificación particular para alterar el producto proteico de cualquier línea celular monoclonal o hibridoma. El nivel de expresión del anticuerpo quimérico debería ser mayor cuando el gen se encuentra en su ubicación cromosómica natural en lugar de en una posición aleatoria. Los métodos detallados para la preparación de anticuerpos quiméricos (humanizados) se pueden encontrar en patente de los EE.UU. 5.482.856.

Anticuerpos humanos intactos.

En otro aspecto, esta divulgación proporciona anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 completamente humanos intactos. Dichos anticuerpos pueden producirse fácilmente de manera análoga a la producción de anticuerpos humanos quiméricos. En este caso, los dominios VH y VL descritos en el presente documento son completamente humanos y pueden modificarse mediante ingeniería genética fácilmente en un anticuerpo sustancialmente completo (*p. ej.*, IgG, IgA, IgM, etc.).

Por ejemplo, se describen métodos para convertir scFv en inmunoglobulinas completamente humanas sustancialmente de longitud completa, *inter alia*, por Braren y col. (2007) Clin. Chem., 53(5): 837-844). En un enfoque descrito por Braren y col. (*Id.*) las regiones constantes de inmunoglobulina humana se sintetizan a partir de ADNc derivado de células mononucleares de sangre periférica humana empleando condiciones de reacción estándar. Los genes de las regiones constantes de las cadenas pesadas de IgG1 e IgG4 humanas (*IGHG1* y *IGHG44*) se amplifican utilizando cebadores de PCR que contienen un sitio *Ascl* y un sitio *KpnI* ($\gamma 1$: GAT CGG TAC CGA TCG GCG CGC CCA AAT CTT GTG ACA AAA CT CAC (SEQ ID NO:54), $\gamma 4$: GAT CGG CGC GCC TTC CAC CAA GGG CCC ATC CGT CTT CCC CCT (SEQ ID NO:55)) y un sitio *SfiI* ($\gamma 1$: GAT CGG CCC AGC CGG CCT CAT TTA CCC GGA GAC AGG GAG AGG CTC TTC (SEQ ID NO:56), $\gamma 4$: GAT CGG CCC AGC CGG CCT CAT TTA CCC AGA GAC AGG GA(SEQ ID NO:57)), los dominios $\gamma 1C_H2-3$ y $\gamma 4C_H2-3$ usando cebadores que contienen un sitio *Ascl* y un sitio *KpnI* ($\gamma 1$: GAT CTC TAG ATC ATT TAC CCG GAG ACA GGG AGA GGC TCT TC (SEQ ID NO:58), $\gamma 1$: GAT CGG CGC GCC CAG CAA CAC CAA GGT GGA CA (SEQ ID NO:59)) y un sitio *XbaI* ($\gamma 1$: GAT CGG CGC GCC AGC CTC CAC CAA GGG CCC AT (SEQ ID NO:60), $\gamma 1$: GAT CTC TAG ATC ATT TAC CCA GAG ACA GGG A γ)).

Para la amplificación de los genes de las regiones constantes de la cadena pesada de IgE humana (*IGH*E) se pueden utilizar cebadores que contengan un sitio *Ascl* (GAT CGG CGC GCC CAT CCG TCT TCC CCT TGA (SEQ ID NO:61)), un sitio *SfiI*, una etiqueta 4xhis (GAT CGG CCC AGC CGG CCT CAT TTA CCG GGA TTT ACA GAC AC (SEQ ID NO:62)), y para los dominios ϵC_H2-4 pueden usarse cebadores que contienen un sitio *Ascl* (GAT CGG CGC GCC CAC CGT GAA GAT CTT AC (SEQ ID NO:63)), un sitio *XbaI* y una etiqueta 4xhis (GAT CTC TAG ATC AAT GGT GGT GAT GTT TAC CGG GAT TTA CAG ACA CCG (SEQ ID NO:64)). La secuencia señal de un gen para la cadena ligera κ de rata se sintetiza mediante cebadores de PCR que contienen un sitio *NheI* (GTA CGC TAG CAA GAT GGA ATC ACA GAC CCA GGT CCT CAT GTC CCT GCT GCT CTG GAT TTC (SEQ ID NO: 65)) y un sitio *KpnI* (CAT GTC CCT GCT GCT CTG GAT TTC TGG TAC CTG TGG GGT GAG TCC TTA CAA CGC GTG TAC (SEQ ID NO:66)). Después de la introducción de la secuencia líder en el vector de expresión de mamíferos, *p. ej.*, pcDNA3.1-zeo (Invitrogen Life Technologies), se pueden insertar los dominios Ig individuales, los dominios Fc y todas las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 4$ y ϵ a través de los sitios *XbaI* y *Ascl*. La transferencia del scFv particular al formato scFv- C_H2-3 o scFv- C_H2-4 se puede realizar mediante la introducción por PCR de un sitio *BsiWI* en el extremo N terminal y un sitio *Ascl* ubicado en el extremo C terminal. Por consiguiente, el ADN se puede ligar en los vectores que contienen la secuencia señal y las regiones constantes particulares.

Para la expresión de los formatos heterotetraméricos de IgG e IgE se puede utilizar el vector de expresión de mamíferos pBudCE4.1 (Invitrogen Life Technologies). El dominio constante de la cadena ligera humana (*IGKC*) se puede amplificar usando un cebador de PCR que contiene un sitio *XbaI* y otro cebador que contiene un sitio *SgfI* (GAT CTC TAG ACT AAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC (SEQ ID NO:67) y GAT CGC GAT CGC ACG AAC TGT GGC TGC ACC ATC TGT C (SEQ ID NO:68)). Las dos secuencias señal humanas VH3-64 e YkI se pueden sintetizar mediante PCR utilizando cebadores con un sitio *NotI* y un sitio *SwaI* interno o un sitio *SaI* y un sitio *SbfI* interno para la inserción de las regiones variables (AGA ATG CGG CCG CTA TGG AAT TGG GGC TGA GCT GGG TTT TCC TTG TTG C TAT ATT TAAA TGT GTC CAG TGT (SEQ ID NO:69) y GAT CGT CGA CAT GGA CAT GAG GGT CCC CGC TCA GCT CCT GGG GCT CCT GCT ACT CTG CCT GCA GGG TGC CAG ATG T (SEQ ID NO: 70)). Después del ensamblaje de las secuencias líderes y las regiones constantes, las regiones variables se pueden introducir a través de los sitios *SgfI* y *SbfI*, o los sitios *Ascl* y *SwaI*, respectivamente. Finalmente, toda la secuencia de cadena ligera, incluida la secuencia líder, puede introducirse a través de los sitios *XbaI* y *SaI* y toda la cadena pesada, incluida la secuencia líder a través de los sitios *NotI* y *SfiI* en el vector de expresión, *p. ej.*, pBudCE4.1.

Estos enfoques son ilustrativos y no limitativos. Los expertos en la materia conocen muchos otros métodos para convertir scFv y otros fragmentos de anticuerpos en inmunoglobulinas de longitud completa.

Diacuerpos.

En determinados aspectos de la divulgación, se contemplan diacuerpos que comprenden uno o más de los dominios V_H y V_L descritos en el presente documento. El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos que tienen normalmente dos sitios de unión a antígeno. Los fragmentos normalmente comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de la cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H - V_L). Utilizando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen los diacuerpos más completamente en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161, y Holliger y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448.

Unicuerpos.

En ciertos aspectos de la divulgación que utilizan la información de secuencia proporcionada en el presente documento, los anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 se pueden construir como unicuerpos. UniBody es una tecnología de anticuerpos que produce un formato de anticuerpo más pequeño estable con una ventana terapéutica anticipada más larga que ciertos formatos de anticuerpos pequeños. En ciertos aspectos, los unicuerpos se producen a partir de anticuerpos IgG4 eliminando la región bisagra del anticuerpo. A diferencia del anticuerpo IgG4 de tamaño completo, el fragmento de media molécula es muy estable y se denomina unicuerpo. Reducir a la mitad la molécula de IgG4 deja solo un área del unicuerpo que puede unirse a una diana. Los métodos para producir unicuerpos se describen en detalle en publicación PCT WO2007/059782 (véase, también, Kofschoten y col. (2007) Science 317: 1554-1557).

Aficuerpos.

En determinados aspectos de la divulgación, la información de secuencia proporcionada en el presente documento se usa para construir moléculas de aficuerpo que se unen a ALPP/ALPPL2. Las moléculas de aficuerpo son una clase de proteínas de afinidad basadas en un dominio proteico de residuos de 58 aminoácidos, derivado de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A estafilocócica. Este dominio de haz de tres hélices se ha utilizado como armazón para la construcción de bibliotecas combinatorias de fagémidos, de las cuales se pueden seleccionar variantes de aficuerpos que se dirigen a las moléculas deseadas utilizando la tecnología de presentación en fagos (véase, p. ej., Nord y col. (1997) Nat. Biotechnol. 15: 772-777; Ronmark y col. (2002) Eur. J. Biochem., 269: 2647-2655.). Los expertos en la materia conocen los detalles de los aficuerpos y los métodos de producción (véase, p. ej., patente de los EE.UU. n.º 5.831.012).

Se reconocerá que los anticuerpos descritos anteriormente pueden proporcionarse como anticuerpos intactos completos (p. ej., IgG), fragmentos de anticuerpo o anticuerpos de cadena sencilla, usando métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Además, mientras que el anticuerpo puede ser esencialmente de cualquier especie de mamífero, para reducir la inmunogenicidad, es deseable utilizar un anticuerpo que sea de la especie en la que se va a utilizar el anticuerpo y/o el inmunoconjugado. En otras palabras, para uso en un humano, es deseable usar un anticuerpo humano, humanizado o quimérico humano.

Medición de la afinidad de unión de anticuerpo/polipéptido.

Tal y como se ha explicado anteriormente, la selección para aumentar la avidéz puede implicar medir la afinidad del anticuerpo por el antígeno diana (p. ej., ALPPL2, especialmente el epítipo unido por uno o más de M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF). Los métodos para hacer tales mediciones son bien conocidos para los expertos en la materia. Brevemente, por ejemplo, la K_d del anticuerpo se determina a partir de la cinética de unión a, p. ej. la célula diana en un BIAcore, un biosensor basado en resonancia de plasmones superficiales. Para esta técnica, el antígeno o la célula (p. ej., una célula que expresa ALPPL2) se acopla a un chip sensor derivatizado capaz de detectar cambios de masa. Cuando el anticuerpo pasa sobre el chip sensor, el anticuerpo se une al antígeno dando como resultado un aumento de masa que es cuantificable. La medición de la tasa de asociación en función de la concentración de anticuerpos se puede utilizar para calcular la constante de la tasa de asociación (k_{on}). Después de la fase de asociación, se pasa tampón sobre el chip y se determina la tasa de disociación del anticuerpo (k_{off}). k_{on} normalmente se mide en el intervalo $1,0 \times 10^2$ a $5,0 \times 10^6$ y k_{off} en el intervalo $1,0 \times 10^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-6}$. La constante de equilibrio K_d a menudo se calcula como k_{off}/k_{on} y por lo tanto se mide normalmente en el intervalo 10^{-5} a 10^{-12} . Las afinidades medidas de esta manera se correlacionan bien con las afinidades medidas en solución mediante titulación de extinción de fluorescencia.

Inmunoconjugados que comprenden anticuerpos que se unen específicamente a ALPP/ALPPL2.

Los anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 prototípicos (p. ej., M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF) descritos en el presente documento se unen específicamente a células cancerosas que expresan ALPPL2 (p. ej., células de cánceres que incluyen, pero sin limitación a mesotelioma, cáncer de testículos, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer pancreático y cáncer de pulmón no microcítico). Los anticuerpos se pueden utilizar solos como agentes terapéuticos (p. ej., para inhibir el crecimiento y/o la proliferación de una célula cancerosa que expresa ALPPL2 o pueden acoplarse a un efector formando inmunoconjugados que proporcionan una administración eficiente y específica del efector (p. ej. citotoxinas, marcadores, radionúclidos, ligandos, anticuerpos, fármacos, liposomas, nanopartículas, partículas víricas, citocinas, moléculas inmunomoduladoras, y similares) a varias células cancerosas que expresan ALPPL2 (p. ej., células cancerosas aisladas, células cancerosas madre, células metastásicas, células de tumor sólido, etc.).

Los inmunocombinados anti-ALPP/ALPPL2 se pueden formar combinando los anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento con un efector (*p. ej.*, un marcador detectable, otro agente terapéutico, *etc.*). Los agentes terapéuticos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, un agente citotóxico o citostático (*p. ej.*, un agente quimioterápico, una toxina (*p. ej.* una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), y/o un isótopo radiactivo (*p. ej.*, un radioconjugado), un segundo anticuerpo.

Efectores ilustrativos.

Marcadores detectables - Composiciones de obtención de imágenes.

En determinadas realizaciones, los inmunocombinados anti-ALPPL2 se pueden utilizar para dirigir marcadores detectables a un sitio tumoral. Esto puede facilitar la detección y/o localización de tumores. Puede ser eficaz para detectar tumores primarios o tumores secundarios producidos por cánceres que expresan ALPPL2 (*p. ej.*, cánceres que incluyen, pero sin limitación a mesotelioma, cáncer de testículos, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer pancreático y cáncer de pulmón no microcítico).

Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el efector comprende un marcador detectable. Los marcadores detectables adecuados incluyen, pero sin limitación a marcadores radio-opacos, nanopartículas, marcadores de PET, marcadores de MRI, marcadores radiactivos y similares. Entre los radionúclidos y útiles en diversas realizaciones, emisores gamma, emisores de positrones, emisores de rayos X y emisores de fluorescencia son adecuados para la localización, diagnóstico, y/o tinción y/o terapia, mientras que los emisores beta y alfa y los agentes captadores de electrones y neutrones, como el boro y el uranio, también se puede utilizar para terapia.

En diversos aspectos de la divulgación, los marcadores detectables se pueden usar junto con un detector externo y/o un detector interno y proporcionan un medio para localizar y/o visualizar eficazmente células cancerosas que expresan ALPPL2. Dicha detección/visualización puede ser útil en diversos contextos, incluidos, pero sin limitación o ajustes preoperatorios e intraoperatorios. Por lo tanto, en determinados aspectos, esta divulgación se refiere a un inmunocombinado para su uso en un método para detectar intraoperatoriamente cánceres que expresan ALPPL2 en el cuerpo de un mamífero. Estos métodos normalmente implican administrar al mamífero una composición que comprende, en una cantidad suficiente para ser detectada por un detector (*p. ej.* una sonda de detección gamma), un anticuerpo anti-ALPPL2 marcado con un marcador detectable como se describe en el presente documento, y, después de permitir que el principio activo sea absorbido por el tejido diana, y preferiblemente después de la eliminación sanguínea del marcador, someter al mamífero a una técnica de radioinmunodetección en la zona relevante del cuerpo, *p. ej.* mediante el uso de una sonda de detección gamma.

En determinados aspectos de la divulgación, el anticuerpo unido al marcador se puede utilizar en la técnica de cirugía radioguiada, en donde los tejidos relevantes en el cuerpo de un sujeto pueden detectarse y localizarse intraoperatoriamente mediante un detector, *p. ej.* una sonda de detección gamma. El cirujano puede, intraoperatoriamente, usar esta sonda para encontrar los tejidos en los que ha tenido lugar la captación del compuesto marcado con un radioisótopo, es decir, *p. ej.* un emisor de fotones gamma de baja energía. En ciertos aspectos de la divulgación, tales métodos son particularmente útiles para localizar y eliminar cánceres secundarios producidos por células metastásicas de un tumor primario.

Los anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 descritos en el presente documento se pueden acoplar directamente al resto radio-opaco (*p. ej.*, en una cisteína disponible) o se pueden unir a un "paquete" (*p. ej.*, un quelato, un liposoma, una micropelícula de polímero, una nanopartícula, *etc.*) que porta, que contiene o que comprende el material radio-opaco, *p. ej.*, tal como se describe más adelante.

Además de los marcadores radio-opacos, otros marcadores también son adecuados para su uso. Las etiquetas detectables adecuadas para su uso en inmunocombinados incluyen cualquier composición detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos o químicos. Los marcadores útiles incluyen perlas magnéticas (*p. ej.*, DYNABEADS™), tintes fluorescentes (*p. ej.*, isotiocianato de fluoresceína, rojo texas, rodamina, proteína fluorescente verde y similares), radiomarcadores (*p. ej.*, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P), enzimas (*p. ej.*, peroxidasa de rábano de caballo, fosfatasa alcalina y otras comúnmente utilizadas en un ELISA), y marcadores colorimétricos como oro coloidal o vidrio o plástico coloreado (*p. ej.* poliestireno, polipropileno, látex, *etc.*) perlas, nanopartículas, puntos cuánticos y similares.

En determinados aspectos de la divulgación, los radiomarcadores adecuados incluyen, pero no se limitan a ⁹⁹Tc, ⁹⁹Tc, ⁹⁷Ru, ⁹⁵Ru, ⁹⁴Tc, ⁹⁰Y, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ⁸⁶Y, ⁷⁷Br, ⁷⁷As, ⁷⁶Br, ⁷⁵Se, ⁷²As, ⁶⁸Ga, ⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁴Cu, ⁶²Cu, ⁶²Cu, ⁵⁹Fe, ⁵⁸Co, ⁵⁷Co, ⁵²Mn, ⁵²Fe, ⁵¹Cr, ⁴⁷Sc, ³H, ³⁵S, ³³P, ³²P, ²²⁵Ac, ²²⁴Ac, ²²³Ra, ²¹³Bi, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ²¹¹At, ²⁰³Pb, ²⁰³Hg, ²⁰¹Tl, ¹⁹⁹Au, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁷Pt, ¹⁸⁷Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁶Re, ¹⁷⁷Lu, ¹⁷⁷Lu, ¹⁷⁵Yb, ¹⁷²Tm, ¹⁶⁹Yb, ¹⁶⁹Yb, ¹⁶⁹Er, ¹⁶⁸Tm, ¹⁶⁷Tm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁶⁶Dy, ¹⁶⁵Tm, ¹⁶⁵Dy, ¹⁶¹Tb, ¹⁵O, ¹⁵N, ¹⁵⁹Gd, ¹⁵⁷Gd, ¹⁵³Sm, ¹⁵³Pb, ¹⁵¹Pm, ¹⁴C, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴³Pr, ¹⁴²Pr, ¹³N, ¹³³I, ¹³¹I, ¹²⁷Te, ¹²⁶I, ¹²⁵Te, ¹²⁵I, ¹²⁴I, ¹²³I, ¹²²Te, ¹²¹Te, ¹²¹Sn, ¹¹C, ¹¹³In, ¹¹¹In, ¹¹¹In, ¹¹¹Ag, ¹¹¹Ag, ¹⁰⁹Pd, ¹⁰⁹Pd, ¹⁰⁷Hg, ¹⁰⁵Ru, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁵Rh y ¹⁰³Ru.

Los medios para detectar tales marcadores son bien conocidos para los expertos en la materia. Por lo tanto, por ejemplo, determinados radiomarcadores pueden detectarse usando película fotográfica, detectores de centelleo, obtención de imágenes PET, MRI y similares. Los marcadores fluorescentes se pueden detectar utilizando un fotodetector para detectar la iluminación emitida. Los marcadores enzimáticos normalmente se detectan proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y los marcadores colorimétricos se detectan simplemente visualizando el marcador coloreado.

Radiosensibilizadores.

En otro aspecto de la divulgación, el efector puede comprender un radiosensibilizador que potencia el efecto citotóxico de la radiación ionizante (p. ej., tal como podría producirse mediante ^{60}Co o una fuente de rayos X) en una célula. Se conocen numerosos agentes radiosensibilizadores e incluyen, pero no se limitan a compuestos derivados de benzoporfirina (véase, p. ej., patente de los EE.UU. 5.945.439), óxidos de 1,2,4-benzotriazina (véase, p. ej., patente de EE. UU. 5.849.738), compuestos que contienen determinadas diaminas (véase, p. ej., patente de los EE.UU. 5.700.825), BCNT (véase, p. ej., patente de los EE.UU. 5.872.107), derivados radiosensibilizadores de amida del ácido nitrobenzoico (véase, p. ej., patente de los EE. UU. 4.474.814), diversos derivados heterocíclicos (véase, p. ej., patente de los EE. UU. 5.064.849), complejos de platino (véase, p. ej., patente de los EE. UU. 4.921.963), y similares.

Emisores alfa.

En determinados aspectos de la divulgación, el efector puede incluir un emisor alfa, es decir un isótopo radiactivo que emite partículas alfa. Recientemente se ha demostrado que los emisores alfa son eficaces en el tratamiento del cáncer (véase, p. ej., McDevitt y col. (2001) Science 294:1537-1540; Ballangrud y col. (2001) Cancer Res. 61: 2008-2014; Borchardt y col. (2003) Cancer Res. 63: 5084-50). Los emisores alfa adecuados incluyen, pero sin limitación a Bi, ^{213}Bi , ^{211}At , y similares.

Quelatos.

Muchos de los productos farmacéuticos y/o radiomarcadores descritos en el presente documento pueden proporcionarse como quelato. La molécula quelante normalmente está acoplada a una molécula (p. ej. biotina, avidina, estreptavidina, etc.) que se une específicamente a una etiqueta de epítipo unida a un anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2 (p. ej., M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF) descritos en el presente documento.

Los grupos quelantes se conocen bien por los expertos en la materia. En determinadas realizaciones, los grupos quelantes se derivan del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido ciclohexil-1,2-diaminotetraacético (CDTA), ácido etilenglicol-O,O'-bis(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido N,N-bis(hidroxibencil)-etilendiamina-N,N'-diacético (HBED), ácido trietilentetramina hexaacético (TTHA), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), ácido hidroxietildiaminotriacético (HEDTA), ácido 1,4,8,11-tetra-azaciclotetradecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (TETA), DTPA sustituido, EDTA sustituido y similares.

Ejemplos de determinados quelantes preferidos incluyen 2-iminotiolanos y 2-iminotiociclohexanos no sustituidos o sustituidos, en particular 2-imino-4-mercaptometiltiolano.

Un agente quelante, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA), es de particular interés debido a su capacidad para quelar una serie de metales importantes desde el punto de vista diagnóstico y terapéutico, como radionúclidos y radiomarcadores.

Se han descrito conjugados de DOTA y proteínas como anticuerpos. Por ejemplo, La patente de los EE.UU. N° 5.428.156 enseña un método para conjugar DOTA con anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Para preparar estos conjugados, un grupo de ácido carboxílico de DOTA se convierte en un éster activo que puede reaccionar con un grupo amina o sulfhidrilo en el anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Lewis y col. (1994) Bioconjugate Chem. 5: 565-576, describe un método similar en donde un grupo carboxilo de DOTA se convierte en un éster activo y el DOTA activado se mezcla con un anticuerpo, uniendo el anticuerpo a DOTA a través del grupo épsilon-amino de un residuo de lisina del anticuerpo, convirtiendo así un grupo carboxilo de DOTA en un resto amida.

En determinadas realizaciones, el agente quelante se puede acoplar, directamente o a través de un conector, a una etiqueta de epítipo o a un resto que se une a una etiqueta de epítipo. Se han descrito conjugados de DOTA y biotina (véase, p. ej., Su (1995) J. Nucl. Med., 36 (5 supl):154P, que divulga la unión de DOTA a biotina a través de derivados de biotina de cadena lateral amino disponibles tal como DOTA-LC-biotina o DOTA-bencil-4-(6-amino-caproamida)-biotina). Yau y col., WO 95/15335, divulgan un método para producir compuestos de nitro-bencil-DOTA que pueden conjugarse con biotina. El método comprende una reacción de ciclación mediante proyección transitoria de un grupo hidroxilo; tosilación de una amina; desprotección del grupo hidroxilo protegido transitoriamente; tosilación del grupo hidroxilo

desprotegido; y ciclación de tosilato intramolecular. Wu y col. (1992) Nucl. Med. Biol., 19(2): 239-244 divulga una síntesis de agentes quelantes macrocíclicos para radiomarcas proteínas con ^{111}In y ^{90}Y . Wu y col. prepara un conjugado DOTA-biotina marcado para estudiar la estabilidad y biodistribución de conjugados con avidina, una proteína modelo para estudios. Este conjugado se preparó utilizando una hidrazida de biotina que contenía un grupo amino libre para reaccionar con un derivado de DOTA activado generado *in situ*.

Citotoxinas/agentes citostáticos.

Los anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 descritos en el presente documento (*p. ej.*, M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF) se pueden utilizar para administrar una variedad de fármacos citotóxicos y/o citostáticos, incluidos fármacos terapéuticos, un compuesto que emite radiación, moléculas citotóxicas de origen vegetal, fúngico o bacteriano, proteínas biológicas, y mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, los fármacos citotóxicos pueden comprender fármacos citotóxicos de acción intracelular que son, *p. ej.*, moléculas orgánicas pequeñas, proteínas o péptidos citotóxicos, emisores de radiación, que incluye, por ejemplo, emisores α de alta energía, de corto alcance como se describe anteriormente, y similares. Los agentes terapéuticos representativos adicionales incluyen radioisótopos, agentes quimioterápicos, agentes inmunomoduladores, agentes antiangiogénicos, agentes antiproliferativos, agentes proapoptóticos y enzimas citolíticas (*p. ej.*, ARNasas). Un agente también puede incluir un ácido nucleico terapéutico, tal como un gen que codifica un agente inmunomodulador, un agente antiangiogénico, un agente antiproliferativo o un agente proapoptótico. Estos descriptores de fármacos no son mutuamente excluyentes y, por tanto, un agente terapéutico puede describirse utilizando uno o más de los términos mencionados anteriormente. Por ejemplo, los radioisótopos seleccionados también son citotoxinas. En diversas realizaciones, los agentes terapéuticos se pueden preparar como sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-ALPPL2 está unido a un fármaco citotóxico/citostático terapéutico. En diversas realizaciones, los fármacos que se utilizan para construir ADC incluyen, pero no se limitan a inhibidores de microtúbulos y agentes que dañan el ADN, inhibidores de la polimerasa (*p. ej.*, el inhibidor de polimerasa II, α -amanitina), y similares. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se conjuga con el fármaco directamente o a través de un conector, mientras que, en otras realizaciones, el anticuerpo se conjuga con un portador de fármaco (*p. ej.*, un liposoma que contiene el fármaco, un vehículo de fármaco polimérico, un vehículo de fármaco de nanopartículas, un vehículo de fármaco lipídico, un vehículo de fármaco dendrímico, y similares).

En determinadas realizaciones, el fármaco comprende un inhibidor de tubulina, que incluye, pero sin limitación a auristatina, dolastatina-10, derivados sintéticos del producto natural dolastatina-10 y maitansina o un derivado de maitansina.

En determinadas realizaciones, el fármaco comprende una auristatina. En determinadas realizaciones, a auristatina se selecciona del grupo que consiste en auristatina E (AE), auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), monometil auristatina D (MMAD) o monometil dolastatina 10, monometil auristatina F (MMAF) o N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-fenilalanina), monometil auristatina E (MMAE) o N-metilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaproína-norefedrina, éster de AE del ácido 5-benzoilvalérico (AEVB), vcMMAE y vcMMAF.

En determinadas realizaciones, el fármaco comprende una enediína. Las enediínas son una clase de productos bacterianos antitumorales caracterizados por anillos de nueve y diez miembros o por la presencia de un sistema cíclico de enlaces triple-doble-triple conjugados. Las enediínas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, caliqueamicina, esperamicina y dinemicina. La caliqueamicina es un antibiótico de enediína que se aisló originalmente como un producto natural del organismo del suelo *Micromonospora echinospora ssp. calichensis* (Zein y col. Science 27; 240(4856):1198-1201, 1988). Genera roturas de ADN bicatenario y posteriormente induce apoptosis en las células diana (Zein y col. Science 27; 240(4856):1198-1201, 1988; Nicolaou y col. Chem. Biol. Septiembre; 1(1):57-66, 1994; Prokop y col. Oncogene 22:9107-9120, 2003). En determinadas realizaciones, el fármaco comprende caliqueamicina o un análogo de caliqueamicina. Se divulgan ejemplos de caliqueamicinas y análogos de las mismas adecuados para su uso en inmunocombinados anti-ALPPL2, por ejemplo, en patentes de los EE.UU. n.º 4.671.958 4.970.198, 5.053.394, 5.037.651, 5.079.233, 5.264.586, y 5.108.912. En determinadas realizaciones, estos compuestos contienen un trisulfuro de metilo que puede hacerse reaccionar con tioles apropiados para formar disulfuros, introduciendo al mismo tiempo un grupo funcional tal como una hidrazida u otro grupo funcional que sea útil para conjugar caliqueamicina con un anticuerpo anti-ALPPL2. También se pueden utilizar análogos de disulfuro de caliqueamicina, por ejemplo, análogos descritos en las patentes de los EE.UU. n.º 5.606.040 y 5.770.710. En determinadas realizaciones, el análogo de disulfuro es dimetilhidrazida de N-acetil-gamma-caliqueamicina.

En determinadas realizaciones, el fármaco comprende una geldanamicina. Las geldanamicinas son antibióticos de benzoquinona y ansamicina que se unen a la Hsp90 (proteína de choque térmico 90) y se han utilizado como fármacos antitumorales. Las geldanamicinas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, 17-AAG (17-N-alilamino-17-

demetoxigeldanamicina) y 17-DMAG (17-dimetilaminoetilamino-17-demetoxigeldanamicina).

En determinadas realizaciones, el fármaco comprende una maitansina. Las maitansinas o sus derivados maitansinoides inhiben la proliferación celular al inhibir la formación de microtúbulos durante la mitosis mediante la inhibición de la polimerización de la tubulina (véase, p. ej., Remillard y col. 91975) Science 189: 1002-1005). Las maitansinas ilustrativas incluyen, pero sin limitación, mertansina (DM1); y un análogo de maitansina tal como DM3 o DM4, así como ansamitocina.

En determinadas realizaciones, el fármaco comprende un taxano. Los taxanos son diterpenos que actúan como agentes antitubulina o inhibidores de la mitosis. Los taxanos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, paclitaxel y docetaxel.

En determinadas realizaciones, el fármaco comprende un agente que interactúa con el ADN. En determinadas realizaciones, el agente que interactúa con el ADN incluye, pero sin limitación, caliqueamicinas, duocarmicinas, pirrolobenzodiazepinas (PBD) y similares.

En otra realización ilustrativa, pero no limitativa, el fármaco comprende una duocarmicina. Las duocarmicinas son agentes que dañan el ADN capaces de ejercer su modo de acción en cualquier fase del ciclo celular. Los agentes que forman parte de esta clase de duocarmicinas suelen tener una potencia en el intervalo picomolar bajo. Duocarmicinas ilustrativas (p. ej., análogos de duocarmicina) que pueden usarse como efectores en las construcciones quiméricas contempladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación a duocarmicina A, duocarmicina B1, duocarmicina B2, duocarmicina C1, duocarmicina C2, duocarmicina D, duocarmicina SA, ciclopropilbenzoindol duocarmicina (CC-1065), centanamicina, raquelmicina, adozelesina, bizelesina, carzelesina y similares.

En otra realización ilustrativa, pero no limitativa, el fármaco comprende una pirrolobenzodiazepina. En determinadas realizaciones, el fármaco comprende un derivado sintético de dos pirrolobenzodiazepinas unidas por una correa de polimetileno flexible. Las pirrolobenzodiazepinas (PBD) y los dímeros de PBD se describen en patente de los EE.UU. n.º 7.528.126 B2. En determinadas realizaciones, la pirrolobenzodiazepina se selecciona del grupo que consiste en: antramycinina (y dímeros de la misma), mazetramicina (y dímeros de la misma), tomamycinina (y dímeros de la misma), protracarcina (y dímeros de la misma), quicamicina (y dímeros de la misma), neotramicina A (y dímeros de la misma), neotramicina B (y dímeros de la misma), DC-81 (y dímeros del mismo), sibiromicina (y dímeros de la misma), porotramicina A (y dímeros de la misma), porotramicina B (y dímeros de la misma), sibanomycinina (y dímeros de la misma), abeimycinina (y dímeros de la misma), SG2000 y SG2285.

En determinadas realizaciones, el fármaco comprende un inhibidor de la polimerasa, que incluye, pero sin limitación, inhibidores de la polimerasa II tales como α -amanitina e inhibidores de la poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP). Inhibidores de PARP ilustrativos incluyen, pero sin limitación, iniparib (BSI 201), talazoparib (BMN-673), olaparib (AZD-2281), olaparib, rucaparib (AG014699, PF-01367338), veliparib (ABT-888), CEP 9722, MK 4827, BGB-290, 3-aminobenzamida, y similares.

En determinadas realizaciones, el fármaco comprende un alquiloide de vinca. Los alquiloides de vinca también son agentes antitubulina. Los alquiloides de vinca ilustrativos incluyen, pero sin limitación, vincristina, vinblastina, vindesina, y vinorelbina.

Los fármacos anteriores son ilustrativos y no limitativos. En diversas realizaciones se pueden utilizar otros fármacos antineoplásicos que incluyen, pero sin limitación, anticuerpos antineoplásicos (p. ej., HERCEPTIN®), antimetabolitos, agentes alquilantes, inhibidores de topoisomerasas, agentes que se dirigen a los microtúbulos, inhibidores de cinasas, inhibidores de la síntesis de proteínas, análogos de somatostatina, glucocorticoides, inhibidores de aromatasa, inhibidores de mTOR, inhibidores de la proteína cinasa B (PKB), fosfatidilinositol, inhibidores de la 3-cinasa (PI3K), inhibidores de cinasa dependiente de ciclina, moléculas anti-TRAIL, inhibidores de MEK y similares. En determinadas realizaciones, los compuestos antineoplásicos incluyen, pero sin limitación a fluorouracilo (5-FU), capecitabina/XELODA, 5-trifluorometil-2'-desoxiuridina, metotrexato sodio, raltitrexed/Tomudex, pemetrexed/Alimta®, arabinósido de citosina (citarabina, Ara-C)/tioguanina, 6-mercaptopurina (mercaptopurina, 6-MP), azatioprina/Azasan, 6-tioguanina (6-TG)/Purinethol (TEVA), Pentostatina/Nipent, fosfato de fludarabina/Fludara®, cladribina (2-CdA, 2-clorodesoxiadenosina)/Leustatin, floxuridina (5-fluoro-2)/FUDR (Hospira, Inc.), inhibidores de la ribonucleótido reductasa (RNR), ciclofosfamida/Cytosan (BMS), neosar, ifosfamida/Mitoxana, tiotepa, BCNU -- 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitosourea, 1,3-bis(2-cloroetil)-3-ciclohexil-nitosourea, metil CCNU, hexametilmelamina, busulfano/Myleran, procarbazona HCl/Matulane, dacarbazina (DTIC), clorambucilo/Leukaran®, melfalán/Alkeran, cisplatino (Cisplatino, CDDP)/Platinol, carboplatino/Paraplatin, oxaliplatino/Eloxitan, bendamustina, carmustina, clorometina, dacarbazina (DTIC), fotemustina, lomustina, manosulfán, nedaplatino, nimustina, prednimustina, ranimustina, satraplatino, semustina, estreptozocina, temozolomida, treosulfano, triazicuona, trietilenmelamina, tiotepa, triplatino tetranitrato, trofosfamida, uramustina, doxorubicina HCl/Doxil, citrato de daunorubicina/Daunoxoma®, mitoxantrona HCl/Novantrone, actinomicina D, etopósido/Vepesid, topotecán HCl/Hycamtin, tenipósido (VM-26), irinotecán HCl (CPT-11)/, Camptosar®, camptotecina, belotecán, rubitecán, vincristina, sulfato de vinblastina, tartrato de vinorelbina, sulfato de vindesina, paclitaxel/Taxol, docetaxel/Taxotere, nanopartículas de paclitaxel abraxano, ixabepilona, larotaxel, ortataxel, tesetaxel, vinflunina y similares. En determinadas realizaciones, los fármacos antineoplásicos comprenden uno o más fármacos

seleccionados del grupo que consiste en carboplatino (*p. ej.*, PARAPLATIN®), cisplatino (*p. ej.*, PLATINOL®, PLATINOL-AQ®), ciclofosfamida (*p. ej.*, CYTOXAN®, NEOSAR®), docetaxel (*p. ej.*, TAXOTERE®), doxorubicina (*p. ej.*, ADRIAMYCIN®), erlotinib (*p. ej.*, TARCEVA®), etopósido (*p. ej.*, VEPESID®), fluorouracilo (*p. ej.*, 5-FU®), gemcitabina (*p. ej.*, GEMZAR®), mesilato de imatinib (*p. ej.*, GLEEVEC®), irinotecán (*p. ej.*, CAMPTOSAR®), metotrexato (*p. ej.*, FOLEX®, MEXATE®, AMETHOPTERIN®), paclitaxel (*p. ej.*, TAXOL®, ABRAXANE®), sorafinib (*p. ej.*, NEXAVAR®), gemcitabina (*p. ej.*, SUTENT®), topotecán (*p. ej.*, HYCAMTIN®), vinblastina (*p. ej.*, VELBAN®), vincristina (*p. ej.*, ONCOVIN®, VINCASAR PFS®). En determinadas realizaciones, el fármaco antineoplásico comprende uno o más fármacos seleccionados del grupo que consiste en ácido retinoico, un derivado del ácido retinoico, doxorubicina, vinblastina, vincristina, ciclofosfamida, ifosfamida, cisplatino, 5-fluorouracilo, un derivado de camptotecina, interferón, tamoxifeno y taxol. En determinadas realizaciones, el compuesto antineoplásico se selecciona del grupo que consiste en abraxano, doxorubicina, pamidronato disódico, anastrozol, exemestano, ciclofosfamida, epirubicina, toremifeno, letrozol, trastuzumab, megestroltamoxifeno, paclitaxel, docetaxel, capecitabina, acetato de goserelina, ácido zolendróico, vinblastina, *etc.*), una molécula antisentido, un ARNip y similares.

En determinadas realizaciones, el agente citotóxico/citostático comprende una toxina proteica o peptídica o un fragmento de la misma. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas están ejemplificadas por el fragmento de la toxina A de difteria, los fragmentos activos de no unión de la toxina de difteria, exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de ricina, la cadena A de abrina, la cadena A de modeccina, α -sacrina, determinadas proteínas de *Aleurites fordii*, determinadas proteínas diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAP, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Morodica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogilina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos, por ejemplo.

En determinadas realizaciones, las citotoxinas pueden incluir, pero sin limitación a exotoxinas de *Pseudomonas*, toxinas de *Difteria*, ricina, abrina y derivadas de las mismas. La exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular 66 kD), secretada por *Pseudomonas aeruginosa*, que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas mediante la inactivación del factor de elongación 2 (EF-2) al catalizar su ribosilación de ADP (catalizando la transferencia del resto ADP ribosilo de NAD oxidado a EF-2).

La toxina contiene tres dominios estructurales que actúan en conjunto para causar citotoxicidad. El dominio Ia (aminoácidos 1-252) media la unión celular. El dominio II (aminoácidos 253-364) es responsable de la translocación al citosol y el dominio III (aminoácidos 400-613) media la ribosilación de ADP del factor de elongación 2, lo que inactiva la proteína y provoca la muerte celular. La función del dominio Ib (aminoácidos 365-399) permanece indefinida, aunque una gran parte de ella, aminoácidos 365-380, se puede eliminar sin pérdida de citotoxicidad. Véase Siegall y col. (1989) J. Biol. Chem. 264: 14256-14261.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo se une a una molécula preferida en la que el dominio Ia (aminoácidos 1 a 252) está delecionado y los aminoácidos 365 a 380 se han delecionado del dominio Ib. En determinadas realizaciones, se puede delecionar todo el dominio Ib y una porción del dominio II (aminoácidos 350 a 394), particularmente si las secuencias delecionadas se reemplazan con un péptido de enlace.

Además, la PE y otras proteínas citotóxicas se pueden modificar adicionalmente usando mutagénesis dirigida al sitio u otras técnicas conocidas en la técnica, para alterar la molécula para una aplicación particular deseada. Por ejemplo, también se pueden usar medios para alterar la molécula de PE de una manera que no afecte sustancialmente las ventajas funcionales proporcionadas por las moléculas de PE descritas en este caso y se pretende que dichas moléculas resultantes queden cubiertas en el presente documento.

Los métodos de clonación de genes que codifican PE fusionadas a diversos ligandos son bien conocidos por los expertos en la materia (*véase, p. ej.*, Siegall y col. (1989) FASEB J., 3: 2647-2652; y Chaudhary y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 4538-4542).

Como PE, la toxina difteria (DT) destruye las células mediante el factor de elongación de ribosilación ADP 2, inhibiendo así la síntesis de proteínas. La toxina de difteria, sin embargo, se divide en dos cadenas, A y B, unidas por un puente disulfuro. A diferencia de PE, la cadena B de DT, que está en el extremo carboxilo, es responsable de la unión al receptor y la cadena A, que está presente en el extremo amino, contiene la actividad enzimática (Uchida y col. (1972) Science, 175: 901-903; Uchida y col. (1973) J. Biol. Chem., 248: 3838-3844).

En determinadas realizaciones, los inmunocongugados de *anticuerpo-toxina de difteria* tienen el dominio de unión al receptor nativo eliminado mediante truncamiento de la cadena B de toxina de difteria. Una toxina de *Diphtheria* modificada ilustrativa es DT388, una DT en el que se elimina la secuencia carboxilo terminal que comienza en el residuo 389 (*véase, p. ej.*, Chaudhary y col. (1991) Bioch. Biophys. Res. Comm., 180: 545-551). Al igual que las citotoxinas quiméricas de PE, las moléculas de DT se pueden conjugar químicamente con el anticuerpo anti-ALPP, pero, en determinadas realizaciones preferidas, el anticuerpo se fusionará con la toxina de *Diphtheria* por medios recombinantes (*véase, p. ej.*, Williams y col. (1990) J. Biol. Chem. 265: 11885-11889).

Inmunomoduladores

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-ALPPL2 están unidos a un inmunomodulador y funcionan para localizar el inmunomodulador en la célula cancerosa/sitio tumoral. Los expertos en la materia conocen numerosos inmunomoduladores que pueden activar una respuesta inmunitaria. En una realización ilustrativa, pero no limitativo, el inmunomodulador comprende un anticuerpo anti-CD3. Los anticuerpos monoclonales anti-CD3 inducen la proliferación de linfocitos T humanos *in vitro* y activar la citólisis específica e inespecífica mediante clones de linfocitos T humanos y linfocitos de sangre periférica humana. La administración *in vivo* de anti-CD3 previene el crecimiento tumoral de un fibrosarcoma de ratón inducido por UV.

En determinadas realizaciones, los inmunomoduladores comprenden agentes que bloquean los puntos de control inmunitarios. Los puntos de control inmunitarios se refieren a una gran cantidad de vías inhibitorias integradas en el sistema inmunitario que son cruciales para mantener la autotolerancia y modular la duración y amplitud de las respuestas inmunes fisiológicas en los tejidos periféricos con el fin de minimizar el daño tisular colateral. Ahora está claro que los tumores cooptan ciertas vías de puntos de control inmunitario como un mecanismo importante de resistencia inmunitaria, particularmente contra linfocitos T que son específicos de antígenos tumorales. Debido a que muchos de los puntos de control inmunitarios se inician mediante interacciones ligando-receptor, pueden bloquearse fácilmente mediante anticuerpos o modularse mediante formas recombinantes de ligandos o receptores.

Los anticuerpos citotóxicos contra el antígeno 4 asociado a linfocitos T (CTLA4) fueron los primeros de esta clase de agentes inmunoterápicos en lograr la aprobación de la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU. (FDA). El primer fármaco de este tipo en recibir aprobación, ipilimumab (Yervoy®), para el tratamiento de melanoma avanzado, bloquea la actividad de una proteína de punto de control conocida como CTLA4, que se expresa en la superficie de células inmunitarias activadas llamadas linfocitos T citotóxicos. CTLA4 actúa como un "interruptor" para inactivar estos linfocitos T, reduciendo así la fuerza de las respuestas inmunitarias; ipilimumab se une a CTLA4 y evita que envíe su señal inhibitoria. Otros dos inhibidores de puntos de control aprobados por la FDA, nivolumab (Opdivo®) y pembrolizumab (Keytruda®), trabajan de manera similar, pero se dirigen a una proteína de punto de control diferente en los linfocitos T activados conocida como PD-1. Nivolumab está aprobado para tratar a algunos pacientes con melanoma avanzado o cáncer de pulmón avanzado, y pembrolizumab está aprobado para tratar a algunos pacientes con melanoma avanzado.

Por consiguiente, en determinadas realizaciones los inmunomoduladores comprenden anticuerpos dirigidos contra CTLA4 (*p. ej.*, ipilimumab), y/o anticuerpos dirigidos contra PD-L1 (*p. ej.*, nivolumab, pembrolizumab) y/o anticuerpos dirigidos contra PD-L2.

Otros ejemplos de inmunomoduladores que pueden unirse al anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2 incluyen, pero sin limitación, ganciclovir, etanorcept, tacrolimus, sirolimus, voclosporina, ciclosporina, rapamicina, ciclofosfamida, azatioprina, micofenolato de mofetilo, metotrexato, glucocorticoide y sus análogos, citocinas, xantinas, factores de crecimiento de células madre, linfoquinas, factor de necrosis tumoral (TNF), factores hematopoyéticos, interleucinas (*p. ej.*, interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18 e IL-21), factores estimuladores de colonias (*p. ej.*, factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)), interferones (*p. ej.*, interferones alfa, interferón beta, interferón gamma), el factor de crecimiento de células madre denominado "factor S 1", eritropoyetina y trombopoyetina o una combinación de los mismos.

Los agentes inmunomoduladores útiles también incluyen antihormonas que bloquean la acción hormonal sobre los tumores y agentes inmunosupresores que suprimen la producción de citocinas, regulan por disminución la expresión de autoantígenos o enmascaran los antígenos del MHC. Las antihormonas representativas incluyen antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, aromatasa que inhibe 4(5)-imidazoles, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona y toremifeno; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y agentes anti-suprarrenales. Los agentes inmunosupresores ilustrativos incluyen, pero no se limitan a pirimidinas 2-amino-6-aryl-5-sustituidas, azatioprina, ciclofosfamida, bromocriptina, danazol, dapsona, glutaraldehído, anticuerpos antiidiotípicos para antígenos de MHC y fragmentos de MHC, ciclosporina A, esteroides tales como glucocorticosteroides, citocinas o antagonistas de los receptores de citocinas (*p. ej.*, anticuerpos anti-interferón, anticuerpos anti-IL10, anticuerpos anti-TNF α , anticuerpo anti-IL2), estreptocinasa, TGF β , rapamicina, receptor de linfocitos T, fragmentos de receptor de linfocitos T y anticuerpos contra receptor de linfocitos T.

Partículas víricas.

En determinadas realizaciones, el efector comprende una partícula vírica (*p. ej.*, un fago filamentoso, un virus adenoasociado (AAV), un lentivirus y similares). El anticuerpo puede conjugarse con la partícula vírica y/o puede expresarse en la superficie de la partícula vírica (*p. ej.* un fago filamentoso). La partícula vírica puede incluir adicionalmente un ácido nucleico que se administrará a la diana (*p. ej.*, una célula cancerosa que expresa ALPPL2). El uso de partículas víricas para administrar ácidos nucleicos a las células se describe en detalle en el documento WO 99/55720, US 6.670.188, US 6.642.051, y patente de los EE.UU. n.º: 6.669.936.

Anticuerpos.

En determinadas realizaciones, el efector comprende otro anticuerpo (*p. ej.*, un segundo anticuerpo). La unión de un anticuerpo efector a un anticuerpo anti-ALPPL2 descrito en el presente documento puede proporcionar un anticuerpo biespecífico. En determinadas realizaciones, el anticuerpo efector comprende un anticuerpo que se une a un epítipo diferente de ALPPL2 (que el unido por el anticuerpo anti-ALPPL2), o una diana diferente en una célula que expresa ALPPL2. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el efector comprende un anticuerpo que se une a un marcador expresado en la superficie de una célula cancerosa tal como una célula de mesotelioma, una célula de cáncer testicular, una célula de cáncer de endometrio y determinadas células de cáncer pancreático, cáncer de ovario y cáncer de pulmón no microcítico.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo efector se une a un resto distinto de un marcador en una célula cancerosa. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el efector puede ser un anticuerpo que se une a CD3 (*p. ej.*, un anticuerpo anti-CD3). Los anticuerpos monoclonales anti-CD3 inducen la proliferación de linfocitos T humanos *in vitro* y activar la citólisis específica e inespecífica mediante clones de linfocitos T humanos y linfocitos de sangre periférica humana. La administración *in vivo* de anti-CD3 previene el crecimiento tumoral de un fibrosarcoma de ratón inducido por UV. Por lo tanto, el anticuerpo efector anti-CD3 se puede utilizar para potenciar una respuesta inmunitaria contra la célula dirigida a anti-ALPPL2.

Otros anticuerpos efectores ilustrativos, pero no limitativos incluyen, anticuerpos dirigidos contra FcγRI (CD64), que se expresa principalmente en monocitos y macrófagos y se regula por incremento tras su activación en neutrófilos, anticuerpos dirigidos contra EpCAM (CD326), y similares.

Los anticuerpos biespecíficos anteriores son ilustrativos y no limitativos y se reconocerá que esencialmente cualquier anticuerpo puede acoplarse a los anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 descritos en el presente documento dependiendo de la aplicación deseada.

B) Unión del Anticuerpo al Efector.

Un experto apreciará que los anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 descritos en el presente documento (*p. ej.*, M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF) y la(s) molécula(s) efectora(s) se pueden unir en cualquier orden. Por lo tanto, si el anticuerpo es un polipéptido de cadena sencilla, la molécula efectora puede unirse a los extremos amino o carboxi terminal de la molécula que se selecciona como diana. Si el anticuerpo comprende más de una cadena de aminoácidos, la molécula efectora puede unirse al extremo amino o carboxi terminal de cualquier péptido que comprenda el anticuerpo. El anticuerpo también puede unirse a una región interna de la molécula efectora, o por el contrario, la molécula efectora puede unirse a una ubicación interna del anticuerpo, siempre y cuando la unión no interfiera con las respectivas actividades de las moléculas.

El anticuerpo y el efector pueden unirse mediante cualquiera de varios medios bien conocidos por los expertos en la materia. Normalmente el efector está conjugado, directamente o a través de un conector (espaciador), con el anticuerpo. Sin embargo, en determinadas realizaciones, si el efector es o comprende un polipéptido, es posible expresar recombinantemente la molécula quimérica como fusión de cadena sencilla del efector con un anticuerpo de cadena sencilla, o como fusión del efector con una cadena de un anticuerpo que comprende más de una cadena.

Conjugación de la molécula efectora al anticuerpo.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 descritos en el presente documento (*p. ej.*, M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF) se pueden conjugar químicamente con la molécula efectora (*p. ej.*, una citotoxina, un marcador, un ligando, un fármaco, un liposoma, *etc.*). Los medios para conjugar químicamente moléculas son bien conocidos por los expertos en la materia.

El procedimiento para unir un efector a un anticuerpo variará de acuerdo con la estructura química del efector y/o anticuerpo. Los polipéptidos suelen contener una variedad de grupos funcionales; *p. ej.*, grupos ácido carboxílico (COOH) o amina libre (-NH₂), que están disponibles para reaccionar con un grupo funcional adecuado en una molécula efectora para unir el efector a la misma.

Como alternativa, el anticuerpo y/o el efector pueden derivatizarse para exponer o unir grupos funcionales reactivos adicionales. La derivatización puede implicar la unión de cualquiera de varias moléculas conectoras tales como las disponibles en Pierce Chemical Company, Rockford Illinois.

Un "conector", como se utiliza en el presente documento, es una molécula que se utiliza para unir la molécula que se selecciona como diana a la molécula efectora. El conector es capaz de formar enlaces covalentes tanto con la molécula que se selecciona como diana como con la molécula efectora. Los conectores adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, conectores de carbono de cadena lineal o ramificada, conectores de carbono heterocíclicos o conectores peptídicos. Si la molécula que se selecciona como diana y la molécula efectora son polipéptidos, los conectores pueden unirse a los aminoácidos constituyentes a través de sus grupos laterales (*p. ej.*, a través de un enlace disulfuro con cisteína). Sin embargo, en una realización preferida, los conectores se unirán a los grupos amino o carboxilo del carbono alfa de los aminoácidos terminales.

Los inmunoconjugados se pueden preparar usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como tolieno 2,6-diisocianato) y compuestos de bis-activo fluorina (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina ricina como se ha descrito en Vitetta y col. (1987) Science 238: 1098. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ilustrativo, pero no limitativo, para la conjugación de, *p. ej.*, un radionucleótido al anticuerpo (véase, *p. ej.*, el documento WO1994/011026 (PCT/US1993/010953)).

En ciertas realizaciones, la conjugación de efectores (*p. ej.*, fármacos, liposomas, *etc.*) o conectores unidos a efectores, a un anticuerpo tiene lugar en aminoácidos reactivos accesibles al disolvente, como lisinas o cisteínas, que pueden derivarse de la reducción de los enlaces disulfuro entre cadenas en el anticuerpo. En determinadas realizaciones, la conjugación de cisteína puede ocurrir después de la reducción de cuatro enlaces disulfuro entre cadenas.

En ciertas realizaciones, la conjugación específica de sitio, en la que un número conocido de conectores-fármacos conjugan consistentemente con sitios definidos en el anticuerpo se puede realizar para producir una construcción altamente homogénea. La relación fármaco-anticuerpo (DAR) se puede controlar con precisión y se puede adaptar a diversos conectores-fármacos, produciendo, por ejemplo, ADC específicos del sitio de 2 o 4 DAR.

Se conocen varios métodos para lograr la conjugación específica de sitio. Por ejemplo, el aminoácido cisteína contiene un grupo tiol reactivo que cumple papeles esenciales en la estructura y función de muchas proteínas. La conjugación de sondas tiorreactivas con proteínas a través de residuos de cisteína ha sido durante mucho tiempo un método para el marcaje de proteínas y también se ha aplicado a la generación de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC). En determinadas realizaciones ilustrativas, pero no limitativas, este proceso implica la reducción parcial de los enlaces disulfuro existentes (*p. ej.*, enlaces disulfuro entre cadenas).

En determinadas realizaciones para mantener enlaces disulfuro, los residuos de cisteína se pueden modificar mediante ingeniería genética en proteínas. El éxito del uso de residuos de cisteína introducidos para la conjugación específica de sitio se basa en la capacidad de seleccionar sitios adecuados en los que la sustitución de cisteína no altera la estructura o función de la proteína. Para lograr esto, El fago Elisa para la selección de tioles reactivos (PHESELECTOR) se desarrolló introduciendo residuos de cisteína reactivos en un Fab de anticuerpo (trastuzumab-Fab 4D5) en varios sitios, mostrando el Fab en fagos y seleccionando para identificar cisteínas reactivas que no interfieran con la unión a antígeno (véase, *p. ej.*, Junutula y col. (2008) J. Immunol. Meth. 332: 41-52).

Se ha demostrado que el enfoque PHESELECTOR es eficiente y específico, especialmente en comparación con la conjugación de cisteína convencional. Se ha demostrado que los sitios óptimos para la cisteína encontrados usando, *p. ej.*, un fragmento de anticuerpo (*p. ej.*, Fab) y el método PHESELECTOR también se pueden aplicar a anticuerpos de longitud completa, y los datos indican que estos sitios funcionan bien para la conjugación específica de sitio con otros Acm (véase, *p. ej.*, Boswell y col. (2011) Bioconjug. Chem. 22: 1994-2004; Boswell y col. (2012) Soc. Nuclear Med. 53: 1454-1461; Shen y col. (2012) Nat. Biotechnol. 30:184-189).

Otra estrategia ilustrativa, pero no limitativa para la conjugación específica de sitio se centra en la inserción de aminoácidos con asas reactivas bioortogonales tales como el aminoácido selenocisteína y el aminoácido no natural, acetilfenilalanina (pAcPhe). Se han desarrollado dos métodos para emplear estos aminoácidos y ambos utilizan codones de parada. Sin embargo, un método incorpora selenocisteína (Sec) emparejando el codón de parada del ópalo, UGA, con una secuencia de inserción Sec y el otro método incorpora acetilfenilalanina en el codón de parada ámbar, UAG, utilizando un par ARNt/aminoacilARNt sintetasa. La selenocisteína, empleada por el primer método, es muy similar al aminoácido, cisteína, pero contiene un átomo de selenio en lugar del átomo de azufre. El grupo selenolato es un nucleófilo más reactivo que su homólogo tiolato, haciéndolo susceptible de conjugación con compuestos electrófilos en condiciones en las que la selenocisteína se activa selectivamente. Hay aproximadamente 25 proteínas conocidas que contienen selenio en los mamíferos, incluyendo proteínas como las glutatión peroxidadas y las tiorreductasas (Kryukov y col. 92003) Science, 300: 1439-1443). En condiciones normales, UGA codifica la terminación transcripcional; sin embargo, en presencia de una secuencia de inserción de Sec (SECIS) ubicada en la

UTR en 3' de proteínas que contienen Sec, la terminación se evita mediante la formación de una estructura secundaria de ARNm y Sec se inserta en el codón UGA (Caban y Copeland (2006) Cell Mol. Life Sci. 63: 73-81). La inserción de Sec se puede modificar mediante ingeniería genética en genes que no codifican Sec mediante la inserción del codón UGA y un SECIS en el extremo 3' del gen. Esta técnica ha sido utilizada, *inter alia*, en el marcaje de Sec y la posterior conjugación específica de sitio de Acm (véase, *p. ej.*, Hofer y col. (2009) Biochem. 48: 12047-12057).

Otro método ilustrativo más para la conjugación específica de sitio utiliza el aminoácido no natural, p-acetilfenilalanina (pAcPhe). pAcPhe contiene un grupo ceto que se puede conjugar selectivamente con un fármaco que contiene una alcoxiamina mediante una unión de oxima. Para incorporar pAcPhe en un anticuerpo, el codón de parada ámbar se sustituye en el anticuerpo en la ubicación deseada. Luego, el ADNc del anticuerpo se coexpresa con un ARNt supresor ámbar y la ARNt sintetasa mutante adecuadamente emparejada. La ARNt sintetasa carga pAcPhe en el ARNt ámbar y, por lo tanto, pAcPhe se incorpora al anticuerpo en el sitio ámbar UAG (véase, *p. ej.*, Liu y col. 92007) Nat. Meth. 4: 239-244; Wang y col. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100: 56-61; Axup (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109: 16101-16116).

Además de pAcPhe, se pueden explotar otros aminoácidos no naturales para su uso en conjugación específica de sitio utilizando procesos similares que involucran pares de ARNt/aminoacil-ARNt sintetasa coincidentes (véase, *p. ej.*, Young (2002) J. Mol. Biol. 395: 361-374; Kiick y col. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, ; 99: 19-24).

En diversas realizaciones, el uso de enzimas para catalizar la formación de enlaces se puede aprovechar para su uso en conjugación específica de sitio. Por ejemplo, la plataforma de glicotransferasa utiliza una glicotransferasa mutante para unir un resto de azúcar químicamente activo a un sitio de glicosilación en un anticuerpo. Luego, las moléculas de elección se pueden conjugar con al asa química del resto de azúcar. En otro enfoque ilustrativo, pero limitativo se utiliza transglutaminasa para formar un enlace entre un grupo amina en el conector/fármaco y un residuo de glutamina modificado genéticamente en el anticuerpo.

Las glicotransferasas son una familia grande de proteínas involucradas en la síntesis de oligosacáridos y son responsables de la transferencia de un residuo de azúcar desde un nucleótido de azúcar activado a un aceptor de azúcar o glicoproteína/lípido. Se conocen las estructuras de varias glicotransferasas y revelan que la especificidad del donante de azúcar está determinada por unos pocos aminoácidos en el bolsillo catalítico (Qasba y col. (2005) Trends Biochem. Sci. 30: 53-62). Usando este conocimiento, los residuos han sido mutados en el bolsillo de la glicotransferasa. *p. ej.*, B4Gal-T1, para ampliar la especificidad del donante y permitir la transferencia del residuo de azúcar químicamente reactivo, 2-ceto-Gal (véase, *p. ej.*, Ramakrishnan y col. (2002) J. Biol. Chem. 277: 20833-20839). Esta tecnología permite la capacidad de transferir un azúcar químicamente reactivo a cualquier lípido o proteína que contenga un sitio de glicosilación. Los anticuerpos IgG humanos contienen un sitio de N-glicosilación en el Asn-297 conservado del fragmento Fc. Los glicanos unidos a este sitio son generalmente complejos, pero se pueden desgalactosilar hasta G0, sobre el cual una glicotransferasa mutante es capaz de transferir C2-ceto-Gal con alta eficiencia (véase, *p. ej.*, Boeggeman y col. (2009) Bioconjug. Chem. 20: 1228-1236). El asa química activa de C2-ceto-Gal se puede acoplar entonces a biomoléculas con un grupo reactivo ortogonal. Este enfoque se ha utilizado con éxito para la conjugación específica del sitio del anticuerpo anti-Her2, trastuzumab, con Alexa Fluor 488 aminoaceticetamida y es una técnica viable para la generación de ADC específicos del sitio (*Id.*).

La segunda plataforma utiliza transglutaminasa para catalizar la formación de un enlace covalente entre un grupo amina libre y una cadena lateral de glutamina. Transglutaminasa de *Streptovorticillium mobaraense* (mTG) está disponible comercialmente y se ha utilizado ampliamente como agente reticulante de proteínas (véase, *p. ej.*, Yokoyama y col. (2004) ALPP. Microbiol. Biotechnol. 64: 447-454). mTG no reconoce ninguno de los residuos de glutamina naturales en la región Fc de los anticuerpos glicosilados, pero reconoce una "etiqueta de glutamina" que puede modificarse genéticamente en un anticuerpo (véase, *p. ej.*, Jeger y col. (2010) Angew Chem. Int. Ed. Engl. 49: 9995-9997). A modo de ilustración, la etiqueta de glutamina, LLQG, ha sido modificada genéticamente en diferentes sitios en el dominio constante de un anticuerpo que se dirige al receptor del factor de crecimiento epidérmico. Luego se usó mTG para conjugar estos sitios con fluoróforos o monometil dolastatina 10 (MMAD) y se encontró que varios sitios tenían buenas propiedades biofísicas y un alto grado de conjugación. mTG también pudo conjugarse con etiquetas de glutamina en anticuerpos anti-Her2 y anti-M1S1. Un conjugado antiM1S1-vc-MMAD mostró una fuerte actividad *in vitro* e *in vivo*, lo que sugiere que la conjugación utilizando este método no altera la unión o la afinidad de los anticuerpos y demuestra la utilidad de este enfoque en la conjugación específica de sitio de ADC (véase, *p. ej.*, Strop y col. (2013) Chem. Biol. 20: 161-167).

Además de las glicotransferasas y transglutaminasas, se han explorado otras enzimas para su uso en el marcaje de proteínas (Sunbul y Yin (2009) Org. Biomol. Chem. 7: 3361-3371). Una enzima de este tipo, enzima generadora de formilglutamina, reconoce la secuencia CxPxR y oxida un residuo de cisteína para formar formilglutamina, generando así una proteína con una etiqueta de aldehído. Luego, el grupo aldehído se puede conjugar con la molécula de elección mediante, *p. ej.*, química hidrozino-Pictet-Spengler.'

Muchos otros procedimientos y moléculas conectoras para la unión de diversos compuestos, incluidos quelatos metálicos con radionúclidos, se conocen toxinas y fármacos para proteínas tal como anticuerpos (véase, *p. ej.*, solicitud de patente europea n.º 188.256; patente de los EE.UU. n.º 4.671.958, 4.659.839, 4.414.148, 4.699.784; 4.680.338;

4.569.789; y 4.589.071; y Borlinghaus y col. (1987) Cancer Res. 47: 4071-4075). En particular, la producción de diversas inmunotoxinas es bien conocida en la técnica y se puede encontrar, por ejemplo en "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet," Thorpe y col., Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, pág. 168-190 (1982), Waldmann (1991) Science, 252: 1657, patentes de los EE.UU. n.º 4.545.985 y 4.894.443.

En algunas circunstancias, es deseable liberar el efector del anticuerpo cuando el inmunoconjugado haya alcanzado su sitio diana. Por lo tanto, se pueden usar inmunoconjugados que comprenden enlaces que son escindibles en las proximidades del sitio diana cuando el efector debe liberarse en el sitio diana. La escisión del enlace para liberar el agente del anticuerpo puede ser provocada por la actividad enzimática o las condiciones a las que se somete el inmunoconjugado ya sea dentro de la célula diana o en las proximidades del sitio diana. Cuando el sitio diana es un tumor, puede usarse un conector que se puede escindir en las condiciones presentes en el sitio del tumor (*p. ej.* cuando se exponen a enzimas asociadas a tumores o a pH ácido).

Los expertos en la materia conocen una variedad de conectores escindibles diferentes. Véase las patentes de los EE.UU. n.º 4.618.492; 4.542.225, y 4.625.014. Los conectores escindibles ilustrativos incluyen, pero sin limitación, conectores lábiles a ácidos, conectores escindibles por proteasa, conectores de disulfuro y similares. Los conectores lábiles a ácidos están diseñados para ser estables a los niveles de pH que se encuentran en la sangre, pero se vuelven inestables y se degradan cuando se encuentra el entorno de pH bajo en los lisosomas. Los conectores escindibles por proteasa también están diseñados para ser estables en sangre/plasma, pero liberan rápidamente el fármaco libre dentro de los lisosomas de las células cancerosas tras la escisión mediante enzimas lisosomales. Aprovechan los altos niveles de actividad proteasa dentro de los lisosomas y normalmente incluyen una secuencia peptídica que es reconocida y escindida por estas proteasas, *p. ej.*, como ocurre con un enlace dipéptido Val-Cit que es rápidamente hidrolizado por catepsinas. Los conectores de disulfuro aprovechan el alto nivel de glutatión reducido intracelular para liberar fármaco libre dentro de la célula.

Por lo tanto, en diversas realizaciones, el conector puede ser estable (no escindible) o hidrolizable (escindible), por lo que se libera después de la entrada celular. Los principales mecanismos por los cuales el fármaco se escinde del anticuerpo incluyen la hidrólisis en el pH ácido de los lisosomas (hidrazonas, acetales y amidas tipo cis-aconitato), escisión de péptidos por enzimas lisosomales (las catepsinas y otras enzimas lisosomales) y reducción de disulfuros. Como resultado de estos mecanismos variables para la escisión, los mecanismos de unión del fármaco al anticuerpo también varían ampliamente y se puede utilizar cualquier conector adecuado.

Un ejemplo de un procedimiento de conjugación adecuado se basa en la conjugación de hidrazidas y otros nucleófilos con los aldehídos generados por la oxidación de los hidratos de carbono que se producen de manera natural en los anticuerpos. Los conjugados que contienen hidrazona se pueden preparar con grupos carbonilo introducidos que proporcionan las propiedades de liberación de fármaco deseadas. También se pueden preparar conjugados con un conector que tenga un disulfuro en un extremo, una cadena de alquilo en el medio y un derivado de hidrazina en el otro extremo. Las antraciclinas son un ejemplo de citotoxinas que pueden conjugarse con anticuerpos mediante esta tecnología.

Los conectores que contienen grupos funcionales distintos de las hidrazonas tienen el potencial de escindirse en el medio ácido de los lisosomas. Por ejemplo, se pueden preparar conjugados a partir de conectores reactivos con tiol que contienen un sitio distinto de una hidrazona que es escindible intracelularmente, tal como ésteres, amidas y acetales/cetales. La camptotecina es un agente citotóxico que se puede conjugar utilizando estos conectores. También se pueden usar cetales preparados a partir de una cetona de anillo de 5 a 7 miembros y que tiene uno de los oxígenos unido al agente citotóxico y el otro a un conector para la unión del anticuerpo. Las antraciclinas también son un ejemplo de citotoxina adecuada para su uso con estos conectores.

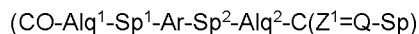
Otro ejemplo de una clase de conectores sensibles al pH son los cis-aconitatos, que tienen un ácido carboxílico yuxtapuesto a un enlace amida. El ácido carboxílico acelera la hidrólisis de amida en los lisosomas ácidos. También se pueden usar conectores que logran un tipo similar de aceleración de la velocidad de hidrólisis con varios otros tipos de estructuras. Los maitansinoides son un ejemplo de una citotoxina que puede conjugarse con conectores unidos en C-9.

Otro método potencial de liberación de conjugados de fármacos es la hidrólisis enzimática de péptidos mediante las enzimas lisosomales. En un ejemplo, se une un péptido mediante un enlace amida al alcohol para-aminobencílico y luego se produce un carbamato o carbonato entre el alcohol bencílico y el agente citotóxico. La escisión del péptido conduce al colapso o autoinmolación, del carbamato o carbonato de aminobencilo. Los agentes citotóxicos ejemplificados con esta estrategia incluyen antraciclinas, taxanos, mitomicina C y las auristatinas. En un ejemplo, también se puede liberar un fenol mediante el colapso del conector en lugar del carbamato. En otra variación, la reducción con disulfuro se utiliza para iniciar el colapso de un carbamato o carbonato de paramercaptobencilo.

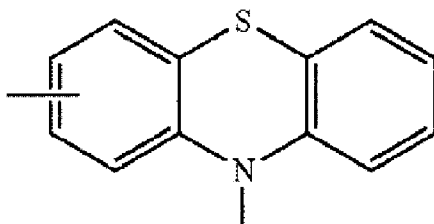
En ciertas realizaciones, los agentes citotóxicos conjugados con anticuerpos tienen poca, si alguna, solubilidad en agua y que puede limitar la carga de fármaco en el conjugado debido a la agregación del conjugado. Un enfoque para superar esto es agregar grupos solubilizadores al conector. Se pueden utilizar conjugados preparados con un conector que consiste en PEG y un dipéptido, incluyendo aquellos que tienen un diácido, tiol-ácido o maleimida-ácido de PEG

unido al anticuerpo, un espaciador dipéptido y un enlace amida a la amina de una antraciclina o un análogo de duocarmicina. Otro ejemplo es un conjugado preparado con un conector que contiene PEG unido por puentes disulfuro a un agente citotóxico y una amida unida a un anticuerpo. Los enfoques que incorporan grupos PEG pueden ser beneficiosos para superar la agregación y los límites en la carga de fármacos.

En determinadas realizaciones, los conectores para la preparación de los conjugados anticuerpo-fármaco descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, conectores que tienen la fórmula:



donde Alq^1 y Alq^2 son independientemente un enlace o cadena de alquileo (C_1-C_{10}) ramificada o no ramificada; Sp^1 es un enlace, $-S-$, $-O-$, $-CONH-$, $-NHCO-$, $-NR'-$, $-N(CH_2CH_2)_2N-$, o $-X-Ar-Y-(CH_2)_n-Z$ en donde X, Y y Z son independientemente un enlace, $-NR'-$, $-S-$, o $-O-$, con la condición de que cuando $n=0$, entonces al menos uno de Y y Z debe ser un enlace y Ar es 1,2-, 1,3- o 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de alquilo (C_1-C_5), alcoxi (C_1-C_4), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$, con la condición de que cuando Alq^1 es un enlace, Sp^1 es un enlace; n es un número entero de 0 a 5; R' es una cadena (C_1-C_5) ramificada o no ramificada opcionalmente sustituida con uno o dos grupos de $-OH$, alcoxi (C_1-C_4), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, dialquilamino (C_1-C_3) o trialquilamonio (C_1-C_3) $-A^-$ donde A^- es un anión farmacéuticamente aceptable que completa una sal; Ar es 1,2-, 1,3- o 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_5), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$ donde n y R' son como se ha definido anteriormente en el presente documento o un 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6-, o 2,7-naftilideno o



con cada naftilideno o fenotiazina opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres o cuatro grupos de alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_5), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$ en donde n y R' son como se han definido anteriormente, con la condición de que cuando Ar es fenotiazina, Sp^1 es un enlace únicamente conectado al nitrógeno; Sp^2 es un enlace, $-S-$, o $-O-$, con la condición de que cuando Alq^2 es un enlace, Sp^2 es un enlace; Z^1 es H, alquilo (C_1-C_5), o fenilo opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de alquilo (C_1-C_5), alcoxi (C_1-C_5), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, $-COOR'$, $-ONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$ en donde n y R' son como se han definido anteriormente; Sp es un radical (C_1-C_{18}) divalente o trivalente de cadena lineal o ramificada, radical arilo o heteroarilo divalente o trivalente, radical cicloalquilo o heterocicloalquilo (C_3-C_{18}) divalente o trivalente, radical aril- o heteroaril- arilo (C_1-C_{18}) divalente o trivalente, radical cicloalquil- o heterocicloalquil-alquilo (C_1-C_{18}) divalente o trivalente o radical alquilo (C_2-C_{18}) insaturado divalente o trivalente, en donde heteroarilo es preferiblemente furilo, tienilo, N-metilpirrolilo, piridinilo, N-metilimidazolilo, oxazolilo, pirimidinilo, quinolilo, isoquinolilo, N-metilcarbazolilo, aminocurmarinilo o fenazinilo y donde si Sp es un radical trivalente, Sp puede sustituirse adicionalmente por grupos dialquilamino (C_1-C_5) inferiores, alcoxi (C_1-C_5) inferiores, hidroxilo, o alquiltio (C_1-C_5) inferiores; y Q es $=NHNCO-$, $=NHNCS-$, $=NHNCONH-$, $=NHNCSNH-$, o $=NHO-$.

En determinadas realizaciones Alq^1 es una cadena de alquileo (C_1-C_{10}) ramificada o no ramificada; Sp^1 es un enlace, $-S-$, $-O-$, $-CONH-$, $-NHCO-$, o $-NR'-$ en donde R' es como se ha definido anteriormente en el presente documento, con la condición de que cuando Alq^1 es un enlace, Sp^1 es un enlace;

Ar es 1,2-, 1,3- o 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_5), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$ en donde n y R' son como se ha definido anteriormente en el presente documento, o Ar es un 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6- o 2,7-naftilideno, cada uno opcionalmente sustituido con uno, dos, tres o cuatro grupos de alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_5), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$; Z^1 es alquilo (C_1-C_5) o fenilo opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de alquilo (C_1-C_5), alcoxi (C_1-C_4), tioalcoxi (C_1-C_4), halógeno, nitro, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$; Alq^2 y Sp^2 son juntos un enlace; y Sp y Q son como se ha definido inmediatamente antes.

La patente de los EE.UU. n.º 5.773.001 divulga conectores que pueden usarse con fármacos nucleofílicos, particularmente hidrazidas y nucleófilos relacionados, preparados a partir de las caliqueamicinas. Estos conectores son especialmente útiles en aquellos casos en los que se obtiene una mejor actividad cuando el enlace formado entre el fármaco y el conector es hidrolizable. Estos conectores contienen dos grupos funcionales, incluyendo (1) un grupo

para reaccionar con un anticuerpo (p. ej., ácido carboxílico) y (2) un grupo carbonilo (p. ej., un aldehído o una cetona) para reaccionar con un fármaco. Los grupos carbonilo pueden reaccionar con un grupo hidrazida del fármaco para formar un enlace hidrazona. Este enlace es escindible, hidrolizable, permitiendo la liberación del agente terapéutico del conjugado después de unirse a las células diana.

En determinadas realizaciones, se pueden usar ésteres de N-hidroxisuccinimida (OSu) u otros ésteres comparativamente activados para generar un resto de conector-fármaco hidrolizable activado. Ejemplos de otros ésteres activadores adecuados incluyen, pero sin limitación, NHS (N-hidroxisuccinimida), sulfo-NHS (NHS sulfonado), PFP (pentafluorofenilo), TFP (tetrafluorofenilo) y DNP (dinitrofenilo).

En determinadas realizaciones, el conector es un conector hidrolizable tal como maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo (MC-vc-PAB-MMAE) o ácido 4-(4-acetilfenoxi)butanoico (AcBut). En determinadas realizaciones, el conector es un conector no hidrolizable tal como maleimidocaproilo (MC-MMAF). En determinadas realizaciones ilustrativas, pero no limitativas, los conjugados anticuerpo-fármaco se pueden preparar usando, por ejemplo, ácido (3-acetilfenil)acético (AcPAc) o ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico (Amida) como molécula conectora.

En determinadas realizaciones, el conector puede ser un conector dipeptídico, como una valina-citrulina (val-cit), un conector de fenilalanina-lisina (phe-lys), o un conector maleimidocaprónico-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonilo (vc), un conector tripeptídico tal como GGG y similares, un conector tetrapeptídico tal como GGGG (SEQ ID NO:71), un conector pentapéptido tal como GGGGS (SEQ ID NO:72) y similares. En determinadas realizaciones, el conector es sulfosuccinimidil-4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato (smcc). La conjugación sulfo-smcc se produce a través de un grupo maleimida que reacciona con sulfhidrilos (tioles, -SH), mientras que su éster Sulfo-NHS es reactivo con las aminas primarias (como las que se encuentran en la lisina y la proteína o péptido N-terminal). Además, en determinadas realizaciones, el conector puede ser maleimidocaproilo (mc).

Los conectores anteriores son ilustrativos y no limitativos. En vista de la gran cantidad de métodos que se han informado para unir una variedad de compuestos de radiodiagnóstico, compuestos radioterápicos, fármacos, toxinas y otros agentes a anticuerpos, un experto en la materia podrá determinar un método adecuado para unir un agente determinado a un anticuerpo u otro polipéptido.

Sistemas de encapsulación conjugados.

Mientras que, en diversas realizaciones los agentes terapéuticos están conjugados químicamente con el anticuerpo, p. ej., como se ha descrito anteriormente, en otras realizaciones, el efector puede comprender un sistema de encapsulación, tal como un cápsida vírica, un liposoma o micela que contiene una composición terapéutica tal como un fármaco, un ácido nucleico (p. ej. un ácido nucleico antisentido e interferencia por ARN, u otro ácido nucleico que se administrará a la célula), u otro resto terapéutico que esté preferiblemente protegido de la exposición directa al sistema circulatorio. Los expertos en la materia conocen bien medios de preparación de lisosomas unidos a anticuerpos (véase, p. ej., patente de los EE.UU. n.º 4.957.735, Connor y col. (1985) Pharm. Ther., 28: 341-365, y similares).

Conjugación de quelatos.

En determinadas realizaciones, el efector comprende un quelato que está unido a un anticuerpo o a una etiqueta de epítipo. El anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2 lleva una etiqueta de epítipo o anticuerpo correspondiente de modo que el simple contacto del anticuerpo con el quelato da como resultado la unión del anticuerpo con el efector. La etapa de combinación se puede realizar antes de usar el resto (estrategia de direccionamiento) o el tejido diana se puede unir al anticuerpo antes de administrar el quelato. Los expertos en la materia conocen bien los métodos para producir quelatos adecuados para acoplarse a diversos restos de direccionamiento (véase, p. ej., patentes de los EE.UU. n.º: 6.190.923, 6.187.285, 6.183.721, 6.177.562, 6.159.445, 6.153.775, 6.149.890, 6.143.276, 6.143.274, 6.139.819, 6.132.764, 6.123.923, 6.123.921, 6.120.768, 6.120.751, 6.117.412, 6.106.866, 6.096.290, 6.093.382, 6.090.800, 6.090.408, 6.088.613, 6.077.499, 6.075.010, 6.071.494, 6.071.490, 6.060.040, 6.056.939, 6.051.207, 6.048.979, 6.045.821, 6.045.775, 6.030.840, 6.028.066, 6.022.966, 6.022.523, 6.022.522, 6.017.522, 6.015.897, 6.010.682, 6.010.681, 6.004.533, y 6.001.329).

Los conectores representativos útiles para la conjugación de radioisótopos incluyen, pero sin limitación, pentaacetato de dietilentriamina (DTPA)-isotiocianato, clorhidrato de nicotinato de succinimidil 6-hidrazinio (SHNH) y hexametilpropilenaminoxima (HMPAO) (véase, p. ej., Bakker y col. (1990) J. Nucl. Med. 31: 1501-1509, Chattopadhyay y col. (2001) Nucl. Med. Biol. 28: 741-744, Dewanjee y col. (1994) J. Nucl. Med. 35: 1054-63, Krenning y col. (1989) Lancet 1: 242-244, Sagiuchi y col. (2001) Ann. Nucl. Med. 15: 267-270); patente de los EE.UU. n.º 6.024.938). Como alternativa, en determinadas realizaciones, el anticuerpo puede derivatizarse para que un radioisótopo pueda unirse directamente a éste (véase, p. ej., Yoo y col. (1997) J. Nucl. Med. 38: 294-300). Los métodos de yodación también son conocidos en la técnica y se pueden encontrar protocolos representativos, por ejemplo, en Krenning y col. (1989) Lancet 1:242-244 y en Bakker y col. (1990) J. Nucl. Med. 31:1501-1509.

Producción de proteínas de fusión.

Cuando el anticuerpo y/o el efector son relativamente cortos (*p. ej.*, menos de aproximadamente 50 aminoácidos) se pueden sintetizar usando técnicas de síntesis química de péptidos estándar. Cuando ambas moléculas son relativamente cortas, la molécula quimérica puede sintetizarse como un único polipéptido contiguo. Como alternativa, la molécula diana y la molécula efectora pueden sintetizarse por separado y después fusionarse mediante condensación del extremo amino terminal de una molécula con el extremo carboxilo terminal de la otra molécula, formando así un enlace peptídico. Como alternativa, cada una de las moléculas diana y efectora puede condensarse con un extremo de una molécula espaciadora peptídica formando así una proteína de fusión contigua.

La síntesis en fase sólida en la que el aminoácido C-terminal de la secuencia está unido a un soporte insoluble seguido de la adición secuencial de los aminoácidos restantes en la secuencia es el método preferido para la síntesis química de los polipéptidos de esta divulgación. Las técnicas para la síntesis en fase sólida se describen en Barany y Merrifield, *Solid-Phase Peptide Synthesis*; págs. 3-284 en *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*. Vol. 2: *Special Methods in Peptide Synthesis*, parte A., Merrifield, y col. J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2156 (1963), y Stewart y col., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª ed. Pierce Chem. Co., Rockford, Ill. (1984).

En determinados aspectos, las proteínas de fusión quiméricas divulgadas en el presente documento se sintetizan utilizando metodología de ADN recombinante. Generalmente esto implica crear una secuencia de ADN que codifica la proteína de fusión, colocar el ADN en un casete de expresión bajo el control de un promotor particular, expresar la proteína en un hospedador, aislar la proteína expresada y, si es necesario, renaturalizar la proteína.

El ADN que codifica las proteínas de fusión divulgadas en el presente documento se puede preparar mediante cualquier método adecuado, que incluye, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas, o síntesis química directa mediante métodos como el método del fosfotriéster de Narang y col. (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 90-99; el método del fosfodiéster de Brown y col. (1979) *Meth. Enzymol.* 68: 109-151; el método de la dietilfosforamida de Beaucage y col. (1981) *Tetra. Lett.*, 22: 1859-1862; y el método de soporte sólido de la patente de los EE.UU. n.º 4.458.066.

La síntesis química produce un oligonucleótido monocatenario. Este se puede convertir en ADN bicatenario mediante hibridación con una secuencia complementaria o mediante polimerización con una ADN polimerasa utilizando la cadena sencilla como plantilla. Un experto reconocería que, si bien la síntesis química del ADN se limita a secuencias de aproximadamente 100 bases, se pueden obtener secuencias más largas mediante la ligación de secuencias más cortas.

Como alternativa, las subsecuencias pueden clonarse y las subsecuencias apropiadas escindir-se usando enzimas de restricción apropiadas. Luego, los fragmentos se pueden ligar para producir la secuencia de ADN deseada.

El ADN que codifica proteínas de fusión de la presente divulgación se puede clonar usando métodos de clonación por PCR.

Mientras que el anticuerpo y el efector están, en determinadas realizaciones, esencialmente unidos directamente entre sí, un experto apreciará que las moléculas pueden separarse mediante un espaciador, *p. ej.*, un espaciador peptídico que consiste en uno o más aminoácidos (*p. ej.*, (Gly₄ser)₃, SEQ ID NO:73). Generalmente el espaciador no tendrá ninguna actividad biológica específica distinta de unir las proteínas o preservar alguna distancia mínima u otra relación espacial entre ellas. Sin embargo, los aminoácidos constituyentes del espaciador pueden seleccionarse para influir en alguna propiedad de la molécula, como el plegamiento, carga neta o hidrofobicidad.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de fusión se pueden expresar en una variedad de células hospedadoras, incluyendo *E. coli*, otros hospedadores bacterianos, levadura y diversas células eucariotas superiores como las líneas celulares COS, CHO y HeLa y líneas celulares de mieloma. El gen de la proteína recombinante se unirá operativamente a secuencias de control de expresión apropiadas para cada hospedador.

Los plásmidos de la divulgación se pueden transferir al interior de la célula hospedadora elegida mediante métodos bien conocidos tales como la transformación con cloruro de calcio para *E. coli* y tratamiento con fosfato de calcio o electroporación para células de mamíferos. Las células transformadas por los plásmidos pueden seleccionarse mediante la resistencia a los antibióticos conferida por genes contenidos en los plásmidos, tales como los genes *amp*, *gpt*, *neo* y *hyg*.

Una vez expresadas, las proteínas de fusión recombinantes pueden purificarse de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, en general, R. Scopes (1982) *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher (1990) *Methods in Enzymology* vol. 182: *Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc. N.Y.). Se prefieren composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente el 90 al 95 % de homogeneidad, prefiriéndose aún más del 98 al 99 % o más de homogeneidad para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad según se desee, los polipéptidos pueden entonces usarse terapéuticamente.

Un experto habitual en la materia reconocería que después de la síntesis química, expresión biológica o purificación, la proteína de fusión puede poseer una conformación sustancialmente diferente a las conformaciones nativas de los polipéptidos constituyentes. En este caso, puede ser necesario desnaturalizar y reducir el polipéptido y después hacer que el polipéptido se repliegue en su conformación preferida. Los expertos en la materia conocen bien métodos para reducir y desnaturalizar proteínas e inducir el replegamiento (véase, *p. ej.*, Debinski y col. (1993) J. Biol. Chem., 268: 14065-14070; Kreitman y Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585; y Buchner, y col. (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270).

Un experto reconocería que se pueden realizar modificaciones en las proteínas de fusión sin disminuir su actividad biológica. Se pueden hacer algunas modificaciones para facilitar la clonación, expresión o incorporación de la molécula diana en una proteína de fusión. Tales modificaciones son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, una metionina añadida en el extremo amino terminal para proporcionar un sitio de iniciación, o aminoácidos adicionales colocados en cualquiera de los extremos para crear sitios de restricción o codones de terminación convenientemente ubicados.

Composiciones farmacéuticas.

Los anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2 descritos en el presente documento (*p. ej.*, M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF) y/o inmunoconjugados de los mismos son útiles para administración parenteral, tópica, oral o local (*p. ej.* inyectada en el sitio del tumor), administración en aerosol o administración transdérmica, para el tratamiento profiláctico, pero principalmente para el tratamiento terapéutico. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en una variedad de formas de dosificación unitaria en función del método de administración. Por ejemplo, las formas de dosificación unitaria adecuadas para la administración oral incluyen polvos, comprimidos, píldoras, cápsulas y pastillas para chupar. Se reconoce que los anticuerpos descritos en el presente documento y/o inmunoconjugados de los mismos y las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos descritos en el presente documento y/o inmunoconjugados de los mismos, cuando se administran por vía oral, están preferiblemente protegidos de la digestión. Esto puede conseguirse por una diversidad de medios conocidos por los expertos en la materia, *p. ej.*, complejando la proteína con una composición para hacerla resistente a la hidrólisis ácida y enzimática o mediante empaquetamiento de la proteína en un vehículo resistente de manera apropiada tal como un liposoma. Los medios de protección de proteínas frente a la digestión se conocen bien en la materia.

En diversos aspectos se divulga una composición, *p. ej.*, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos anti-ALPP/ALPPL2, o porción (porciones) de unión a antígeno de los mismos, o inmunoconjugados de los mismos, formulado junto con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (*p. ej.*, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es *decir*, anticuerpo, inmunoconjugado, se puede recubrir con un material para proteger el compuesto de la acción de los ácidos y de otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo y/o el inmunoconjugado se pueden administrar en la forma "nativa" o, si se desea, en la forma de sales, ésteres, amidas, profármacos, derivados y similares, siempre que la sal, éster, amida, profármaco o derivado sea adecuado farmacológicamente, es *decir*, eficaz en el (los) presente(s) método(s). Las sales, ésteres, amidas, profármacos y otros derivados de los agentes activos pueden prepararse usando procedimientos estándar conocidos por los expertos en la materia de la química orgánica sintética y pueden describirse, por ejemplo, en March (1992) Advanced Organic Chemistry; Reactions, Mechanisms and Structure, 4ª Ed. N. Y. Wiley-Interscience, y como se ha descrito anteriormente.

A modo de ilustración, se puede preparar una sal farmacéuticamente aceptable para cualquiera de los anticuerpos y/o inmunoconjugados descritos en el presente documento que tenga una funcionalidad capaz de formar una sal. Una sal farmacéuticamente aceptable es cualquier sal que retiene la actividad del compuesto original y no imparte ningún efecto perjudicial o adverso sobre el sujeto al que se administra y en el contexto en el que se administra.

En diversas realizaciones, las sales farmacéuticamente aceptables pueden derivarse de bases orgánicas o inorgánicas. La sal puede ser un ión mono o polivalente. De particular interés son los iones inorgánicos, litio, sodio, potasio, calcio y magnesio. Las sales orgánicas pueden prepararse con aminas, particularmente sales de amonio tales como mono-, di- y trialquilaminas o etanolaminas. También se pueden formar sales con cafeína, trometamina y moléculas similares.

Métodos de formulación de agentes farmacéuticamente activos como sales, ésteres, amida, profármacos y similares son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las sales se pueden preparar a partir de la base libre utilizando una metodología convencional que normalmente implica la reacción con un ácido adecuado. En general, la forma básica del fármaco se disuelve en un disolvente orgánico polar como metanol o etanol y a esto se añade el ácido. La sal resultante precipita o se puede sacar de la solución mediante la adición de un disolvente menos polar. Los ácidos adecuados para preparar sales de adición de ácido incluyen, pero sin limitación, tanto ácidos orgánicos, *p. ej.*, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico, y similares, así como ácidos inorgánicos, *p. ej.*, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. Una sal de adición de ácido se puede reconvertir en la base libre mediante tratamiento con una base adecuada. Determinadas sales de adición de ácido particularmente preferidas de los agentes activos en el presente documento incluyen sales de haluro, tales como pueden prepararse usando ácidos clorhídrico o bromhídrico. Por el contrario, la preparación de sales básicas de los agentes activos de esta divulgación se prepara de manera similar usando una base farmacéuticamente aceptable tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de amonio, hidróxido de calcio, trimetilamina, o similares. Las sales básicas particularmente preferidas incluyen sales de metales alcalinos, *p. ej.*, la sal de sodio y las sales de cobre.

Para la preparación de formas salinas de fármacos básicos, el pKa del contraión es preferiblemente al menos aproximadamente 2 unidades de pH menor que el pKa del fármaco. Análogamente, para la preparación de formas salinas de fármacos ácidos, el pKa del contraión es preferiblemente al menos aproximadamente 2 unidades de pH mayor que el pKa del fármaco. Esto permite que el contraión lleve el pH de la solución a un nivel inferior al $pH_{\max}$ para llegar a la meseta de sal, en la que la solubilidad de la sal prevalece sobre la solubilidad del ácido o base libre. La regla generalizada de diferencia en unidades pKa del grupo ionizable en el ingrediente farmacéutico activo (API) y en el ácido o base tiene como objetivo hacer que la transferencia de protones sea energéticamente favorable. Cuando el pKa del API y del contraión no son significativamente diferentes, se puede formar un complejo sólido, pero puede desproporcionarse rápidamente (*es decir*, descomponerse en las entidades individuales de fármaco y contraión) en un entorno acuoso.

Preferiblemente, el contraión es un contraión farmacéuticamente aceptable. Las formas de sales aniónicas adecuadas incluyen, pero sin limitación, acetato, benzoato, bencilato, bitartrato, bromuro, carbonato, cloruro, citrato, edetato, edisilato, estolato, fumarato, gluceptato, gluconato, bromhidrato, clorhidrato, yoduro, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metil bromuro, metil sulfato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato (embonato), fosfato y difosfato, salicilato y disalicilato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tosilato, trietoduro, valerato y similares, mientras que las formas de sales catiónicas adecuadas incluyen, pero sin limitación, a aluminio, benzatina, calcio, etilendiamina, lisina, magnesio, meglumina, potasio, procaína, sodio, trometamina, cinc, y similares.

La preparación de ésteres normalmente implica la funcionalización de grupos hidroxilo y/o carboxilo que están presentes dentro de la estructura molecular del anticuerpo y/o inmuconjugado. En determinadas realizaciones, los ésteres son normalmente derivados sustituidos con acilo de grupos alcohol libres, es decir, restos que se derivan de ácidos carboxílicos de fórmula $RCOOH$ donde R es alquilo y preferiblemente es alquilo inferior. Los ésteres pueden reconvertirse en ácidos libres, si se desea, mediante el uso de procedimientos convencionales de hidrogenólisis o hidrólisis.

Las amidas también se pueden preparar usando técnicas conocidas por los expertos en la materia o descritas en la bibliografía pertinente. Por ejemplo, se pueden preparar amidas a partir de ésteres, usando reactivos de amina adecuados, o pueden prepararse a partir de un anhídrido o un cloruro de ácido mediante reacción con amoníaco o una alquilamina inferior.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos y/o inmuconjugados descritos en el presente documento se pueden administrar solas o en combiterapia, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la combiterapia puede incluir un anticuerpo o inmuconjugado con al menos uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como los agentes antineoplásicos descritos más adelante. Las composiciones farmacéuticas también se pueden administrar junto con radioterapia y/o cirugía.

Una composición que comprende los anticuerpos y/o inmuconjugados descritos en el presente documento se pueden administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciarán lo expertos en la materia, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán al compuesto contra su rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o se conocen generalmente por los expertos en la materia (*véase, p. ej.*, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978).

En determinados aspectos de la divulgación, la administración de un anticuerpo o inmunoconjugado anti-ALPP/ALPPL2 puede facilitarse recubriendo la composición de anticuerpo o inmunoconjugado, o coadministrando el anticuerpo o inmunoconjugado, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, soluciones tampón salinas y acuosas. Los liposomas incluyen, pero sin limitación, emulsiones CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan y col. (1984) J. Neuroimmunol, 7: 27).

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas estériles o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones estériles inyectables o dispersiones. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la materia. Excepto en el caso de que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas normalmente son estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La(s) composición (composiciones) puede(n) formularse como una solución, una microemulsión, en un lípido o liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para contener alta(s) concentración (concentraciones) de fármaco. En determinadas realizaciones, el vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. Puede lograrse la absorción prolongada de las composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo (*p. ej.*, anticuerpos y/o inmunoconjugados descritos en el presente documento) en la cantidad necesaria en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización por microfiltración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación ilustrativos incluyen el secado al vacío y el secado en frío (liofilización) que producen un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir una solución del mismo previamente esterilizada por filtración.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (*p. ej.*, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los anticuerpos y/o inmunoconjugados descritos en el presente documento se pueden administrar una o dos veces al día, o una o dos veces por semana, o una o dos veces al mes mediante inyección subcutánea.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria usada en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico necesario. Las especificaciones para las formas de dosificación unitaria de la invención están dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto que se vaya a lograr y (b) de las limitaciones inherentes en la técnica de formar compuestos de dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

En determinadas realizaciones, la formulación comprende un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito de sodio, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de los anticuerpos y/o inmunoconjugados descritos en el presente documento incluyen aquellas adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la materia de farmacia. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo particular de administración. La cantidad

de ingrediente activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación individual generalmente será esa cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. En general, del cien por ciento, esta cantidad variará desde aproximadamente el 0,001 por ciento a aproximadamente el noventa por ciento de principio activo, preferentemente de aproximadamente 0,005 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, lo más preferentemente de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente 30 por ciento.

Las formulaciones de anticuerpos y/o inmunoconjugados descritas en el presente documento que son adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en pulverización que contienen tales vehículos que en la técnica se sabe que son apropiados. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de anticuerpos y/o inmunoconjugados descritos en el presente documento incluyen polvos, pulverizaciones, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. En determinadas realizaciones, el compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón, o propelente que pueda requerirse.

Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tal como se usan en el presente documento significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección e incluyen, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, inyección epidural e intraesternal e infusión.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos y/o inmunoconjugados descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y similares. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

En diversas realizaciones, estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como agentes conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. Los ejemplos particulares de adyuvantes que son bien conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, adyuvantes inorgánicos (como sales de aluminio, *p. ej.*, fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio), adyuvantes orgánicos (*p. ej.*, escualeno), adyuvantes a base de aceite, virosomas (*p. ej.*, virosomas que contienen una hemaglutinina unida a la membrana y una neuraminidasa derivada del virus de la influenza).

La prevención de la presencia de microorganismos en formulaciones se puede asegurar mediante procedimientos de esterilización y/o mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol de ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma inyectable del fármaco se puede llevar a cabo mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Cuando los anticuerpos y/o inmunoconjugados descritos en el presente documento se administran como productos farmacéuticos, a humanos y animales, se pueden administrar solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, del 0,001 al 90 % (más preferiblemente, del 0,005 al 70 %, tal como del 0,01 al 30 %) de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los anticuerpos y/o inmunoconjugados descritos en el presente documento, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Los niveles reales de dosificación de los ingredientes activos (*p. ej.*, anticuerpos y/o inmunoconjugados descritos en el presente documento) en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin que sean tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, o el éster, la sal o la amida de las mismas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, afección, salud general e historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en las artes médicas. Un médico o veterinario que tenga experiencia en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o el veterinario podría empezar con dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta conseguir el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de anticuerpos

y/o inmunoconjugados descritos en el presente documento será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Tal dosis eficaz generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente. En determinadas realizaciones, se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferentemente administrada de manera próxima al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse como dosificación única, o como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados durante todo el día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria. Aunque es posible que los anticuerpos y/o inmunoconjugados descritos en el presente documento se administren solos, es normalmente preferible administrar el (los) compuesto(s) como una formulación farmacéutica (composición).

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización ilustrativa, se pueden administrar los anticuerpos y/o inmunoconjugados descritos en el presente documento con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos divulgados en las patentes de los EE.UU. n.º 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824, o 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos útiles bien conocidos se describen, por ejemplo, en patente de los EE.UU. n.º 4.487.603, que divulga una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamento a una tasa controlada, en la patente de los EE.UU. n.º 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel, en la patente de los EE.UU. n.º 4.447.233, que divulga una bomba de infusión de medicamento para suministrar medicamento a una tasa de infusión precisa, en la patente de los EE.UU. n.º 4.447.224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco, en la patente de los EE.UU. n.º 4.439.196, que divulga un sistema de administración de fármacos osmóticos que tiene compartimentos multicámara, y en la patente de los EE.UU. n.º 4.475.196, que divulga un sistema de administración osmótica de fármaco. Muchos otros de estos implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la materia.

Los anticuerpos y/o inmunoconjugados anti-ALPP/ALPPL2 descritos en el presente documento se pueden formular para garantizar una distribución adecuada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BHM) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la divulgación cruzan la BHM (sí se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de fabricación de liposomas, véanse, *p. ej.*, patentes de los EE.UU. n.º 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más grupos que se transportan de manera selectiva en células u órganos específicos, mejorando de este modo la administración dirigida de fármaco (véase, *p. ej.*, Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685). Los restos de direccionamiento ilustrativos incluyen, pero no se limitan a folato o biotina (véase, *p. ej.*, patente de los EE.UU. n.º 5.416.016); manósidos (Umezawa y col., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); anticuerpos (Bloeman y col. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; Owais y col. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor de proteína A del tensioactivo (Briscoe y col. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134).

Kits.

Cuando se usa un efector radiactivo, u otro, como agente diagnóstico y/o terapéutico, frecuentemente es imposible poner la composición lista para su uso a disposición del usuario, debido a la vida útil, a menudo corta, del compuesto radiomarcado y/o a la corta vida media del radionúclido utilizado. En tales casos, el usuario puede realizar la reacción de marcado con el radionúclido en el hospital clínico, consultorio médico o laboratorio. Para este fin, u otros fines, los distintos ingredientes de la reacción pueden ofrecerse entonces al usuario en forma de un denominado "kit". El kit está preferiblemente diseñado de manera que las manipulaciones necesarias para realizar la reacción deseada sean lo más simples posible para permitir al usuario preparar a partir del kit la composición deseada utilizando las instalaciones que están a su disposición. Por lo tanto, en el presente documento se divulga un kit para preparar una composición de acuerdo con esta divulgación.

En determinados aspectos de la divulgación, dicho kit comprende uno o más anticuerpos o inmunoconjugados descritos en el presente documento. Los anticuerpos o inmunoconjugados pueden proporcionarse, si se desea, con vehículo inerte farmacéuticamente aceptable y/o se añade/se añaden agentes de formulación y/o adyuvantes. Además, el kit incluye opcionalmente una solución de una sal o quelato de un radionúclido adecuado (u otro agente activo), y (iii) instrucciones de uso con receta para administrar y/o hacer reaccionar los ingredientes presentes en el kit.

El kit que se suministrará al usuario también puede comprender el o los ingredientes definidos anteriormente, junto con instrucciones para su uso, mientras que la solución de una sal o quelato del radionúclido, definido sub (ii) anterior, solución que tiene una vida útil limitada, puede ponerse a disposición del usuario por separado.

El kit puede comprender opcionalmente, adicionalmente un agente reductor y/o, si se desea, un quelante y/o instrucciones de uso de la composición y/o una receta para hacer reaccionar los ingredientes del kit para formar el (los) producto(s) deseado(s). Si se desea, los ingredientes del kit se pueden combinar, siempre que sean compatibles.

El inmunoconjugado puede producirse simplemente combinando los componentes en un medio neutro y haciéndolos reaccionar. Para ello, el efector puede presentarse al anticuerpo, por ejemplo, en forma de un quelato.

Cuando el (los) constituyente(s) del kit se utiliza(n) como componente(s) para la administración farmacéutica (por ejemplo, como líquido para inyección), son preferiblemente estériles. Cuando el (los) componente(s) se proporcionan en estado seco, el usuario deberá utilizar preferentemente una solución salina fisiológica estéril como disolvente. Si se desea, el (los) constituyente(s) puede(n) estabilizarse de la manera convencional con estabilizadores adecuados, por ejemplo, ácido ascórbico, ácido gentísico o sales de estos ácidos, o pueden comprender otros agentes auxiliares, por ejemplo, cargas, tal como glucosa, lactosa, manitol, y similares.

Si bien los materiales de instrucción, cuando están presentes, por lo general, comprenden materiales escritos o impresos, pero no se limitan a ellos. Esta divulgación contempla cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Tales medios incluyen, pero no se limitan a medios de almacenamiento electrónico (*p. ej.*, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (*p. ej.*, CD ROM) y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones de sitios de Internet que proporcionan dichos materiales de instrucción.

Construcciones del receptor de antígeno quimérico (CAR) y terapia.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento se pueden utilizar en la creación de construcciones/células para la terapia con linfocitos T-CAR. La terapia con linfocitos T-CAR es una inmunoterapia celular que implica la administración a un mamífero que tiene cáncer (*p. ej.*, un paciente con cáncer) células genéticamente modificadas (*p. ej.*, linfocitos T, linfocitos citotóxicos naturales (NK), linfocitos T citotóxicos (CTL), linfocitos T reguladores, y similares) que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) y que actúan sobre las células tumorales (que interactúan con el CAR) y provocan la apoptosis de las células tumorales.

Normalmente, las células genéticamente modificadas se preparan expresando en una célula (*p. ej.*, un linfocito T) un CAR que tiene regiones variables de un anticuerpo (VL y VH) combinadas con una cadena CD3 (dominio intracelular) usando una técnica de transferencia génica. CAR es un término general para una proteína quimérica en la que una cadena ligera (VL) y una cadena pesada (VH) de una región variable de un anticuerpo monoclonal específico para un antígeno tumoral (*p. ej.*, un anticuerpo anti-ALPP/ALPPL2 descrito en el presente documento) están unidas en serie, que luego se unen a una cadena de receptor de linfocitos T (TCR) en el lado C-terminal. Se describen más detalles de la terapia con linfocitos T-CAR, *inter alia*, en Nakazawa y col. (2013) *Shinshu Med. J.* 61(4): 197-203.

En determinadas realizaciones, el receptor de antígeno quimérico (CAR) comprende un dominio extracelular e intracelular. El dominio extracelular comprende un elemento de unión específico de diana, también denominado resto de unión a antígeno que se une específicamente a ALPPL2. En diversas realizaciones, el elemento de unión específico de diana comprende un anticuerpo anti ALPPL2 como se define en las reivindicaciones.

En diversas realizaciones, el dominio intracelular o de otro modo el dominio citoplasmático comprende, una o más regiones de señalización coestimuladoras, y en diversas realizaciones, una porción de la cadena zeta. La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. En diversas realizaciones, las moléculas coestimuladoras son moléculas de la superficie celular distintas de los receptores de antígenos o sus ligandos que se requieren para una respuesta eficaz de los linfocitos al antígeno.

Entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana del CAR, o entre el dominio citoplasmático y el dominio transmembrana del CAR, puede incorporarse un dominio espaciador. Como se utiliza en el presente documento, el término "dominio espaciador" generalmente significa cualquier oligo- o polipéptido que funcione para unir el dominio transmembrana a, ya sea el dominio extracelular o, el dominio citoplasmático en la cadena polipeptídica. En diversas realizaciones, el dominio espaciador puede comprender hasta 300 aminoácidos, o en diversas realizaciones de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 aminoácidos, y en ciertas realizaciones de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 aminoácidos.

Resto de unión al antígeno CAR

En determinadas realizaciones, el elemento de unión específico de diana comprende un dominio de unión de anticuerpo M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF. En determinadas realizaciones, el elemento de unión específico de diana comprende un anticuerpo M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF.

Dominio transmembrana

Con respecto al dominio transmembrana, el CAR puede diseñarse para que comprenda un dominio transmembrana que esté fusionado al dominio extracelular del CAR. En una realización, se utiliza el dominio transmembrana que naturalmente está asociado con uno de los dominios en el CAR. En algunos casos, el dominio transmembrana puede seleccionarse o modificarse mediante sustitución de aminoácidos para evitar la unión de dichos dominios a los dominios transmembrana de las proteínas de membrana de superficie iguales o diferentes para minimizar las interacciones con otros miembros del complejo receptor.

En diversas realizaciones, el dominio transmembrana puede derivarse de una fuente natural o sintética. Si la fuente es natural, el dominio puede derivar de cualquier proteína transmembrana o unida a membrana. Ejemplos ilustrativos, pero no limitativos de regiones transmembrana de uso particular en las construcciones CAR contempladas en este caso pueden derivarse de (es decir comprender al menos la(s) región (regiones) transmembrana de) la cadena alfa, beta o zeta del receptor de linfocitos T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154. Como alternativa, el dominio transmembrana puede ser sintético, en cuyo caso puede comprender residuos predominantemente hidrófobos tales como leucina y valina. En determinadas realizaciones, un triplete de aa de fenilalanina, triptófano y valina se encontrará en cada extremo de un dominio transmembrana sintético. Opcionalmente, un conector oligo- o polipeptídico corto, *p. ej.*, entre 2 y aproximadamente 10 aminoácidos de longitud pueden formar el enlace entre el dominio transmembrana y el dominio de señalización citoplasmático del CAR. En determinadas realizaciones, un doblete de glicina-serina proporciona un conector particularmente adecuado.

En determinada realización, el dominio transmembrana del CAR comprende un dominio transmembrana CD8. En una realización ilustrativa, pero no limitativa, el dominio transmembrana CD8 comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys (SEQ ID NO:74). En determinadas realizaciones ilustrativas, pero no limitativas, el dominio transmembrana CD8 puede codificarse mediante la secuencia de ácido nucleico ATCTACATCT GGGCGCCCTT GGCCGGGACT TGTGGGGTCC TTCTCCTGTC ACTGGTTATC ACCCTTTACT GC (SEQ ID NO:75).

En determinadas realizaciones, el dominio transmembrana del CAR puede comprender o consistir en el dominio de bisagra CD8 α . En una realización ilustrativa, pero no limitativa, el dominio de bisagra CD8 α comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Glyl Ala Val Hhis Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr (SEQ ID NO:76). En determinadas realizaciones ilustrativas, pero no limitativas, el dominio de bisagra CD8 α puede codificarse por la secuencia de ácido nucleico ACCACGACGC CAGCGCCGCG ACCACCAACA CCGGCGCCCA CCATCGCGTC GCAGCCCCTG TCCCTGCGCC CAGAGGCGTG CCGGCCAGCG GCGGGGGGCG CAGTGCACAC GAGGGGGGCTG GACTTCGCCT GTGAT (SEQ ID NO:77).

Dominio citoplasmático

El dominio citoplasmático o de otro modo el dominio de señalización intracelular del CAR es responsable de la activación de al menos una de las funciones efectoras normales de la célula inmunitaria en la que se ha colocado el CAR. El término "función efectora" se refiere a una función especializada de una célula. Una función efectora de un linfocito T, por ejemplo, puede ser actividad citolítica o actividad auxiliar, incluida la secreción de citocinas. Por tanto, el término "dominio de señalización intracelular" se refiere a la porción de una proteína que transduce la señal de la función efectora y dirige a la célula para que realice una función especializada. Aunque normalmente se puede emplear todo el dominio de señalización intracelular, en muchos casos no es necesario utilizar toda la cadena. En la medida en que se utilice una porción truncada del dominio de señalización intracelular, dicha porción truncada se puede utilizar en lugar de la cadena intacta siempre que transduzca la señal de la función efectora. Por lo tanto, se pretende que el término dominio de señalización intracelular incluya cualquier porción truncada del dominio de señalización intracelular suficiente para transducir la señal de la función efectora.

Ejemplos ilustrativos, pero no limitativos de dominios de señalización intracelular para su uso en el CAR pueden incluir una secuencia citoplasmática del receptor de linfocitos T (TCR) y correceptores que actúan en concierto para iniciar la transducción de señales después de la participación del receptor de antígeno, así como cualquier derivado o variante de estas secuencias y cualquier secuencia sintética que tenga la misma capacidad funcional.

Se sabe que las señales generadas a través del TCR solo a menudo son insuficientes para la activación completa del linfocito T y que también se requiere una señal secundaria o coestimuladora. Por lo tanto, se puede decir que la activación de linfocitos T está mediada por dos clases distintas de secuencias de señalización citoplasmáticas: aquellas que inician la activación primaria dependiente de antígeno a través del TCR (secuencias de señalización citoplasmáticas primarias) y aquellas que actúan de manera independiente del antígeno para proporcionar una señal secundaria o coestimuladora (secuencias de señalización citoplasmáticas secundarias).

Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias regulan la activación primaria del complejo TCR ya sea de forma estimulante o inhibidora. Las secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que actúan de manera estimuladora pueden contener motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basados en tirosina de inmunorreceptores o ITAM.

Ejemplos ilustrativos, pero no limitativos de ITAM que contienen secuencias de señalización citoplasmáticas primarias que son de uso particular en los CAR contemplados en el presente documento de la invención incluyen aquellos derivados de TCR zeta, FcR gamma, FcR beta, CD3 gamma, CD3 delta, CD3 épsilon, CD5, CD22, CD79a, CD79b y CD66d. Se prefiere particularmente que la molécula de señalización citoplasmática en el CAR de la invención comprenda una secuencia de señalización citoplasmática derivada de CD3 zeta.

En una realización ilustrativa, pero no limitativa, el dominio citoplasmático del CAR puede diseñarse para que comprenda el dominio de señalización CD3-zeta por sí mismo o combinado con cualquier otro dominio citoplasmático deseado útil en el contexto del CAR. Por ejemplo, el dominio citoplasmático del CAR puede comprender una porción de la cadena zeta de CD3 y una región de señalización coestimuladora. La región de señalización coestimuladora se refiere a una porción del CAR que comprende el dominio intracelular de una molécula coestimuladora. Una molécula coestimuladora es una molécula de la superficie celular distinta de un receptor de antígeno o sus ligandos que se requiere para una respuesta eficaz de los linfocitos a un antígeno. Ejemplos de dichas moléculas incluyen, pero sin limitación, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, antígeno 1 asociado a la función de los linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, y un ligando que se une específicamente con CD83 y similares. En una realización ilustrativa, el elemento de señalización coestimulador comprende 4-1BB.

Las secuencias de señalización citoplasmática dentro de la porción de señalización citoplasmática del CAR pueden unirse entre sí en un orden aleatorio o específico. Opcionalmente, un conector oligo- o polipeptídico corto, *p. ej.*, entre 2 y aproximadamente 10 aminoácidos de longitud puede formar el enlace. En determinadas realizaciones, un doblete de glicina-serina proporciona un conector particularmente adecuado.

En una realización ilustrativa, pero no limitativa, el dominio citoplasmático está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28. En otra realización, el dominio citoplasmático está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de 4-1BB. En otra realización más, el dominio citoplasmático está diseñado para comprender el dominio de señalización de CD3-zeta y el dominio de señalización de CD28 y 4-1BB.

En una realización, el dominio citoplasmático en el CAR de la invención está diseñado para comprender el dominio de señalización de 4-1BB y el dominio de señalización de CD3-zeta, en donde el dominio de señalización de 4-1BB comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Gly gly cys Glu Leu (SEQ ID NO:78) y/o el dominio de señalización de CD3-zeta comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly ARg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg (SEQ ID NO: 79).

En una realización ilustrativa, pero no limitativa, el dominio de señalización de 4-1BB está codificado por una secuencia de ácido nucleico que comprende o consiste en la secuencia AACGCGGGCA GAAAGAACT CCTGTATATA TTCAAACAAC CATTATGAG ACCAGTACAA ACTACTCAAG AGGAAGATGG CTGTAGCTGC CGATTTCCAG AAGAAGAAGA AGGAGGATGT GAACTG (SEQ ID NO:80). En una realización ilustrativa, pero no limitativa, el dominio de señalización de CD3-zeta está codificado por un ácido nucleico que comprende o consiste en la secuencia AGAGTGAAGT TCAGCAGGAG CGCAGACGCC CCCGCGTACA AGCAGGGCCA GAACCAGCTC TATAACGAGC TCAATCTAGG ACGAAGAGAG GAGTACGATG TTTTGGACAA GAGACGTGGC CGGGACCCCTG AGATGGGGGG AAAGCCGAGA AGGAAGAACC CTCAGGAAGG CCTGTACAAT GAACTGCAGA AAGATAAGAT GGCGGAGGCC TACAGTGAGA TTGGGATGAA AGGCGAGCGC (SEQ ID NO:81).

Las realizaciones anteriores son ilustrativas y no limitativas. Utilizando las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, los numerosos CAR dirigidos contra ALPPP y/o ALPPL2 estarán disponibles para un experto en la materia.

Vectores

Se divulga una construcción de ADN que comprende secuencias de un CAR como se divulga en el presente documento. En determinados aspectos de la divulgación, el CAR que comprende un resto de unión a antígeno que se une específicamente a ALPP y/o ALPPL2, y/o a un dominio de ALPP y/o ALPPL2 unido por el anticuerpo M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF, en donde la secuencia de ácido nucleico del resto de unión a antígeno está operativamente unida a la secuencia de ácido nucleico de un dominio intracelular. Un dominio intracelular ilustrativo que se puede usar en el CAR de la invención incluye, entre otros, el dominio intracelular de CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares. En algunos casos, el CAR puede comprender cualquier combinación de CD3-zeta, CD28, 4-1BB y similares.

En un aspecto, el CAR de la divulgación comprende un scFv anti-ALPP/ALPPL2 (*p. ej.*, M25AD, M25ADX, M25, *etc.*), un dominio transmembrana y de bisagra CD8 humano, y dominios de señalización 4-1BB y CD3zeta humanos.

Las secuencias de ácido nucleico que codifican las moléculas deseadas se pueden obtener usando métodos recombinantes conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, seleccionando bibliotecas de células que expresan el gen, derivando el gen de un vector que se sabe que lo incluye, o aislándolo directamente de células y tejidos que lo contienen, utilizando dichas técnicas. Como alternativa, el gen de interés puede producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

En ciertos aspectos de la divulgación, se proporcionan vectores en los que se inserta una secuencia de ácido nucleico que codifica un CAR como se describe en el presente documento. Los vectores derivados de retrovirus como el lentivirus son herramientas adecuadas para lograr la transferencia génica a largo plazo, ya que permiten la integración estable a largo plazo de un transgén y su propagación en células hijas. Los vectores lentivirales tienen la ventaja adicional sobre los vectores derivados de oncorretrovirus como los virus de la leucemia murina en el sentido de que pueden transducir células no proliferativas, como los hepatocitos. También tienen la ventaja añadida de una baja inmunogenicidad.

En breve resumen, la expresión de ácidos nucleicos naturales o sintéticos que codifican CAR se puede lograr uniendo operativamente un ácido nucleico que codifica el polipéptido CAR o porciones del mismo a un promotor, e incorporando la construcción en un vector de expresión. Los vectores pueden ser adecuados para la replicación e integración en eucariotas. Los vectores de clonación típicos contienen terminadores de transcripción y traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión de la secuencia de ácido nucleico deseada.

Las construcciones de expresión descritas en el presente documento también se pueden usar para inmunización con ácidos nucleicos y terapia génica, utilizando protocolos estándar de administración de genes. Los métodos para administrar genes se conocen bien en la técnica (*véase, p. ej.*, patentes de los EE.UU. n.º 5.399.346, 5.580.859, y 5.589.466). En determinadas realizaciones, se proporcionan vectores de terapia génica.

El ácido nucleico que codifica el CAR se puede clonar en varios tipos de vectores. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede clonar en un vector que incluye, pero sin limitación, un plásmido, un fagémido, un derivado de fago, un virus animal y un cósmido. Los vectores de particular interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas y vectores de secuenciación.

En ciertos aspectos de la divulgación, el vector de expresión se puede proporcionar a una célula en forma de un vector viral. La tecnología de vectores virales es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook y col. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York), y en otros manuales de virología y biología molecular. Los virus que son útiles como vectores incluyen, pero sin limitación, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes y lentivirus (incluidos los vectores lentivirus de autoinactivación). En general, un vector adecuado contiene un origen de replicación funcional en al menos un organismo, una secuencia promotora, sitios de endonucleasa de restricción convenientes y uno o más marcadores seleccionables (*véase, p. ej.*, WO 01/96584; WO 01/29058; y patente de los EE.UU. n.º 6.326.193).

Se han desarrollado varios sistemas virales para la transferencia de genes a células de mamíferos. Por ejemplo, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente para los sistemas de administración de genes. Un gen seleccionado puede insertarse en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales usando técnicas conocidas en la técnica. Luego, el virus recombinante puede aislarse y administrarse a las células del sujeto, ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Se conocen en la técnica numerosos sistemas retrovirales. En algunos aspectos, se usan vectores de adenovirus. Se conocen en la técnica numerosos vectores de adenovirus. En un aspecto, se usan vectores de lentivirus.

Elementos promotores adicionales, *p. ej.*, potenciadores, regulan la frecuencia de iniciación transcripcional. Normalmente, estos están ubicados en la región 30-110 pb en dirección 5' del sitio de inicio, aunque recientemente se ha demostrado que varios promotores también contienen elementos funcionales en dirección 3' del sitio de inicio. El espacio entre los elementos promotores frecuentemente es flexible, de modo que la función del promotor se conserva cuando los elementos se invierten o se mueven entre sí. En el promotor de la timidina cinasa (tk), el espacio entre los elementos promotores se puede aumentar a 50 pb antes de que la actividad comience a disminuir. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de forma cooperativa o independiente para activar la transcripción.

Un ejemplo de un promotor adecuado es la secuencia promotora temprana inmediata del citomegalovirus (CMV). Esta secuencia promotora es una secuencia promotora constitutiva fuerte capaz de impulsar altos niveles de expresión de cualquier secuencia polinucleotídica unida operativamente a la misma. Otro ejemplo de un promotor adecuado es el factor de crecimiento y alargamiento-1alfa (EF-1α). Sin embargo, también pueden utilizarse otras secuencias promotoras constitutivas, que incluye, pero sin limitarse al promotor temprano del virus simio 40 (SV40), virus de tumor de mama de ratón (MMTV), promotor de repetición terminal larga (LTR) del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), promotor de MoMuLV, un promotor del virus de la leucemia aviar, un promotor temprano inmediato del virus de

Epstein-Barr, un promotor del virus del sarcoma de Rous, así como promotores de genes humanos tales como, pero sin limitación, el promotor de actina, el promotor de miosina, el promotor de hemoglobina y el promotor de creatina cinasa. Además, las construcciones no se limitan al uso de promotores constitutivos y también se contemplan promotores inducibles y/o específicos de tejido. El uso de un promotor inducible proporciona un interruptor molecular capaz de activar la expresión de la secuencia polinucleotídica a la que está unida operativamente cuando se desea dicha expresión, o desactivar la expresión cuando no se desea la expresión. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen, pero sin limitación a promotor de metalotionina, un promotor de glucocorticoides, un promotor de progesterona y un promotor de tetraciclina.

En determinados aspectos de la divulgación, para evaluar la expresión de un polipéptido CAR o porciones del mismo, el vector de expresión que se va a introducir en una célula también puede contener un gen marcador seleccionable o un gen indicador o ambos para facilitar la identificación y selección de células de expresión de la población de células que se busca transfectar o infectar a través de vectores virales. En otros aspectos, el marcador seleccionable puede transportarse en una pieza separada de ADN y usarse en un procedimiento de cotransfección. Tanto los marcadores seleccionables como los genes indicadores pueden estar flanqueados con secuencias reguladoras apropiadas para permitir la expresión en las células hospedadoras. Los marcadores seleccionables útiles incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos, tales como neo y similares.

Pueden usarse genes indicadores para identificar células potencialmente transfectadas y para evaluar la funcionalidad de secuencias reguladoras. En general, un gen indicador es un gen que no está presente en ni expresado por el organismo o tejido receptor y que codifica un polipéptido cuya expresión se manifiesta mediante alguna propiedad fácilmente detectable, *p. ej.*, actividad enzimática. La expresión del gen indicador se analiza en un momento adecuado después de que el ADN se haya introducido en las células receptoras. Los genes indicadores adecuados pueden incluir genes que codifican luciferasa, beta-galactosidasa, cloranfenicol acetil transferasa, fosfatasa alcalina secretada, o el gen de la proteína verde fluorescente (*p. ej.*, Ui-Tei y col. (2000) FEBS Letts. 479: 79-82). Los sistemas de expresión adecuados son bien conocidos y pueden prepararse usando técnicas conocidas u obtenerse comercialmente. En general, la construcción con la región flanqueante en 5' mínima que muestra el nivel más alto de expresión del gen indicador se identifica como el promotor. Dichas regiones promotoras pueden unirse a un gen indicador y usarse para evaluar la capacidad de los agentes para modular la transcripción impulsada por el promotor.

Se conocen en la técnica métodos para introducir y expresar genes en una célula. En el contexto de un vector de expresión, el vector puede introducirse fácilmente en una célula huésped, *p. ej.*, célula de mamífero, bacteriana, de levadura o de insecto mediante cualquier método en la técnica. Por ejemplo, el vector de expresión se puede transferir a una célula hospedadora mediante medios físicos, químicos o biológicos.

Los métodos físicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen precipitación con fosfato de calcio, lipofección, bombardeo de partículas, microinyección, electroporación y similares. Los métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son bien conocidos en la técnica (*véase, p. ej.*, Sambrook y col. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). Un ejemplo ilustrativo, pero no limitativo para la introducción de un polinucleótido en una célula hospedadora es la transfección con fosfato de calcio.

Los métodos biológicos para introducir un polinucleótido de interés en una célula hospedadora pueden incluir el uso de vectores de ADN y ARN. Los vectores virales, y especialmente los vectores retrovirales, se han convertido en el método más utilizado para insertar genes en mamíferos, *p. ej.*, células humanas. Otros vectores virales pueden derivarse de lentivirus, *poxvirus*, virus del herpes simple I, adenovirus y virus adenoasociados, y similares (*véase, p. ej.*, patentes de los EE.UU. n.º 5.350.674 y 5.585.362, y similares).

Los medios químicos para introducir un polinucleótido en una célula hospedadora incluyen sistemas de dispersión coloidales, como complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos, incluidas emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Un sistema coloidal ilustrativo para su uso como vehículo de administración *in vitro* e *in vivo* es un liposoma (*p. ej.*, una vesícula de membrana artificial).

En el caso de que se utilice un sistema de administración no viral, un vehículo de administración ilustrativo es un lípido y/o un liposoma. Se contempla el uso de formulaciones lipídicas para la introducción de los ácidos nucleicos en una célula hospedadora (*in vitro*, *ex-vivo* o *in vivo*). En otro aspecto, El ácido nucleico puede asociarse con un lípido. El ácido nucleico asociado con un lípido puede encapsularse en el interior acuoso de un liposoma, intercalarse dentro de la bicapa lipídica de un liposoma, unirse a un liposoma a través de una molécula de enlace que está asociada tanto con el liposoma como con el oligonucleótido, atraparse en un liposoma, complejarse con un liposoma, dispersarse en una solución que contiene un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, contenerse en suspensión en un lípido, contenerse o formar complejos con una micela, o asociarse de otro modo con un lípido. Las composiciones asociadas a lípido, lípido/ADN o lípido/vector de expresión no se limitan a ninguna estructura particular en solución. Por ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". También pueden simplemente intercalarse en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes en tamaño o forma. Los lípidos son sustancias grasas que pueden ser lípidos naturales o sintéticos. Por ejemplo, los lípidos incluyen las gotitas de grasa que se encuentran naturalmente en el citoplasma, así como la clase de

compuestos que contienen hidrocarburos alifáticos de cadena larga y sus derivados, tales como ácidos grasos, alcoholes, aminas, aminoalcoholes y aldehídos.

En diversos aspectos de la divulgación, los lípidos adecuados para su uso se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, dimiristilfosfatidilcolina ("DMPC") puede obtenerse de Sigma, St. Louis, Mo.; fosfato de dicetilo ("DCP") puede obtenerse de K & K Laboratories (Plainview, N.Y.); colesterol ("Choi") puede obtenerse de Calbiochem-Behring; dimiristilfosfatidilglicerol ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.). Las soluciones madre de lípidos en cloroformo o cloroformo/metanol se pueden almacenar a aproximadamente -20 °C. El cloroformo se puede utilizar como único disolvente ya que se evapora más fácilmente que el metanol. "Liposoma" es un término genérico que abarca una variedad de vehículos lipídicos monolaminares y multilaminares formados por la generación de bicapas o agregados lipídicos encerrados. Los liposomas se pueden caracterizar por tener estructuras vesiculares con una membrana de bicapa de fosfolípidos y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos se reorganizan antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas. Ghosh y col. (1991) *Glycobiology* 5: 505-510). Sin embargo, también se incluyen composiciones que tienen estructuras en solución diferentes a las de la estructura vesicular normal. Por ejemplo, los lípidos pueden asumir una estructura micelar o simplemente existir como agregados no uniformes de moléculas lipídicas. También se contemplan complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

Independientemente del método utilizado para introducir ácidos nucleicos exógenos en una célula hospedadora o exponer de otro modo una célula al inhibidor de la presente divulgación, para confirmar la presencia de la secuencia de ADN recombinante en la célula hospedadora, puede realizarse una diversidad de ensayos. Tales ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos de "biología molecular" bien conocidos por los expertos en la materia, como inmunotransferencia tipo Southern y Northern, RT-PCR y PCR; ensayos "bioquímicos", como detección de la presencia o ausencia de un péptido particular, *p. ej.*, por medios inmunológicos (ELISA e inmunotransferencia tipo Western) o mediante ensayos descritos en el presente documento para identificar agentes que caen dentro del alcance de la divulgación.

Fuentes de células inmunitarias

En ciertos aspectos de la divulgación antes de la expansión y modificación genética de las células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos T) descritas en el presente documento, se obtiene una fuente de linfocitos T de un sujeto. Los linfocitos T pueden obtenerse de una serie de fuentes, que incluyen células mononucleares de sangre periférica, médula ósea, tejido de ganglio linfático, sangre de cordón, tejido del timo, tejido de un sitio de infección, ascitis, derrame pleural, tejido del bazo y tumores. En determinados aspectos de la divulgación, puede usarse cualquiera de varias líneas de linfocitos T disponibles en la técnica. En determinados aspectos de la divulgación, Las células T se pueden obtener a partir de una unidad de sangre extraída de un sujeto usando cualquiera de varias técnicas conocidas por el experto en la materia, tal como separación por FICOLL™. En un aspecto ilustrativo, las células de la sangre circulante de un individuo se obtienen mediante aféresis. El producto de aféresis normalmente contiene linfocitos, incluyendo linfocitos T, monocitos, granulocitos, linfocitos B, otros glóbulos blancos sanguíneos nucleados, eritrocitos, y plaquetas. En un aspecto, las células recogidas mediante aféresis se pueden lavar para eliminar la fracción de plasma y colocar las células en un tampón o medio apropiado para las etapas de procesamiento posteriores. En un aspecto de la divulgación, se lavaron células con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En un aspecto alternativo, la solución de lavado carece de calcio y puede carecer de magnesio o puede carecer de muchos, si no de todos, los cationes divalentes. De nuevo, sorprendentemente, las etapas de activación iniciales en ausencia de calcio pueden conducir a una activación aumentada. Como apreciarán fácilmente los expertos en la materia, una etapa de lavado se puede realizar mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, como mediante el uso de una centrífuga de "flujo continuo" semiautomática (por ejemplo, el procesador celular Cobe 2991, Baxter CytoMate o Haemonetics Cell Saver 5) según las instrucciones del fabricante. Después del lavado, las células pueden resuspenderse en una variedad de tampones biocompatibles, tal como, por ejemplo, PBS libre de Ca^{2+} , libre de Mg^{2+} , PlasmaLyte A u otra solución salina con o sin tampón. Como alternativa, los componentes indeseables de la muestra de aféresis pueden eliminarse y las células resuspenderse directamente en medios de cultivo.

En otro aspecto ilustrativo, linfocitos T se aíslan de los linfocitos de sangre periférica lisando los glóbulos rojos y agotando los monocitos. por ejemplo, por centrifugación a través de un gradiente PERCOLL™ o por elutriación centrífuga a contraflujo. Una subpoblación específica de linfocitos T, tal como linfocitos T CD3^+ , CD28^+ , CD4^+ , CD8^+ , CD45RA^+ y CD45RO^+ , puede aislarse aún más mediante técnicas de selección positiva o negativa. Por ejemplo, en un aspecto, los linfocitos T se aíslan mediante incubación con perlas conjugadas anti-CD3/anti-CD28 (es decir, 3x28), como DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T, durante un período de tiempo suficiente para la selección positiva de los linfocitos T. En un aspecto ilustrativo, el período de tiempo es de aproximadamente 30 minutos. En determinados aspectos ilustrativos, el período de tiempo oscila de 30 minutos a 36 horas o más y todos los valores enteros intermedios. En un aspecto determinado, el período de tiempo es al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 horas. En otro aspecto más, el período de tiempo es de 10 a 24 horas. En un aspecto, el periodo de tiempo de incubación es de 24 horas. Se pueden usar tiempos de incubación más prolongados para aislar linfocitos T en cualquier situación donde haya pocas células T en comparación con otros tipos de células, como el aislamiento de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) de tejido tumoral o de individuos inmunocomprometidos. Además, el uso de tiempos de incubación más prolongados

puede aumentar la eficiencia de captura de linfocitos T CD8⁺. Por lo tanto, simplemente acortando o alargando el tiempo que se permite que los linfocitos T se unan a las perlas CD3/CD28 y/o aumentando o disminuyendo la relación de perlas con respecto a linfocitos T (como se describe más adelante en el presente documento), las subpoblaciones de linfocitos T se pueden seleccionar preferentemente a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros puntos temporales durante el proceso. Adicionalmente, aumentando o disminuyendo la relación de anticuerpos anti-CD3 y/o anti-CD28 en las perlas u otra superficie, las subpoblaciones de linfocitos T se pueden seleccionar preferentemente a favor o en contra al inicio del cultivo o en otros puntos temporales deseados. El experto en la materia reconocería que también se pueden usar múltiples rondas de selección en el contexto de esta divulgación. En determinados aspectos, puede ser conveniente realizar el procedimiento de selección y utilizar las células "no seleccionadas" en el proceso de activación y expansión. Las células "no seleccionadas" también pueden someterse a rondas de selección adicionales.

El enriquecimiento de una población de linfocitos T mediante selección negativa se puede lograr con una combinación de anticuerpos dirigidos a marcadores de superficie exclusivos de las células seleccionadas negativamente. Un método es la clasificación y/o selección de células mediante inmunoadherencia magnética negativa o citometría de flujo que utiliza un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos a marcadores de la superficie celular presentes en las células seleccionadas negativamente. Por ejemplo, para enriquecer células CD4⁺ mediante selección negativa, un cóctel de anticuerpos monoclonales normalmente incluye anticuerpos contra CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR y CD8. En determinados aspectos, puede ser deseable enriquecer o seleccionar positivamente linfocitos T reguladores que normalmente expresan CD4⁺, CD25⁺, CD62L^{hi}, GITR⁺ y FoxP3⁺. Como alternativa, en determinados aspectos, los linfocitos T reguladores se agotan mediante perlas conjugadas anti-CD25 u otro método de selección similar.

Para el aislamiento de una población deseada de células mediante selección positiva o negativa, se puede variar la concentración de células y superficie (por ejemplo, partículas tal como perlas). En determinados aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las perlas y las células (es decir, incrementar la concentración de células), para garantizar el máximo contacto de células y perlas. Por ejemplo, en un aspecto, se utiliza una concentración de 2 mil millones de células/ml. En un aspecto, se utiliza una concentración de 1 mil millones de células/ml. En otro aspecto, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En otro aspecto, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otro aspecto más, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En aspectos adicionales, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un aumento del rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficiente de células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, como linfocitos T CD28 negativos, o de muestras donde hay muchas células tumorales presentes (es decir, sangre leucémica, tejido tumoral, etc.). Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficiente de linfocitos T CD8⁺ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En otro aspecto, puede ser deseable utilizar concentraciones más bajas de células. Al diluir significativamente la mezcla de células T y de superficie (p. ej., partículas tal como cuentas), se minimizan las interacciones entre las partículas y las células. Esto selecciona células que expresan grandes cantidades de antígenos deseados para unirse a las partículas. Por ejemplo, los linfocitos T CD4⁺ expresan niveles más altos de CD28 y se capturan de manera más eficiente que los linfocitos T CD8⁺ en concentraciones diluidas. En un aspecto, la concentración de células utilizadas es 5×10^6 /ml. En otro aspecto, la concentración utilizada puede ser de aproximadamente 1×10^5 /ml a 1×10^6 /ml y cualquier valor entero intermedio.

En determinados aspectos, las células pueden incubarse en un rotador durante períodos de tiempo variables a velocidades variables, ya sea entre 2 y 10 °C o a temperatura ambiente.

Los linfocitos T para estimulación también se pueden congelar después de una etapa de lavado. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, la etapa de congelación y descongelación posterior proporciona un producto más uniforme al eliminar los granulocitos y, en cierta medida, los monocitos de la población celular. Después de la etapa de lavado que elimina el plasma y las plaquetas, las células pueden suspenderse en una solución de congelación. Si bien en la técnica se conocen muchas soluciones y parámetros de congelación y serán útiles en este contexto, un método implica el uso de PBS que contiene el 20 % de DMSO y el 8 % de albúmina sérica humana, o medios de cultivo que contienen el 10 % de dextrano 40 y el 5 % de dextrosa, el 20 % de albúmina sérica humana y el 7,5 % de DMSO, o el 31,25 % de Plasmalyte-A, el 31,25 % de dextrosa al 5 %, el 0,45 % de NaCl, el 10 % de dextrano 40 y el 5 % de dextrosa, el 20 % de albúmina sérica humana y el 7,5 % de DMSO u otros medios de congelación de células adecuados que contengan, por ejemplo, Hespán y Plasmalyte A, las células se congelan entonces hasta -80 °C, p. ej., a una velocidad de 1 °C por minuto y se almacenan en la fase de vapor de un tanque de almacenamiento con nitrógeno líquido. Se pueden utilizar otros métodos de congelación controlada, así como la congelación incontrolada inmediatamente a -20 °C o en nitrógeno líquido.

En determinados aspectos, las células crioconservadas se descongelan y se lavan como se describe en el presente documento y se dejan reposar durante una hora a temperatura ambiente antes de la activación usando los métodos de la presente divulgación.

También se contempla la recogida de muestras de sangre o producto de aféresis de un sujeto en un período de tiempo anterior al momento en que podrían necesitarse las células expandidas como se describe en el presente documento. Como tal, la fuente de las células que se van a expandir se puede recoger en cualquier momento necesario y las células deseadas, tal como linfocitos T, se aíslan y se congelan para su uso posterior en la terapia con linfocitos T para cualquier número de enfermedades o afecciones que se beneficiarían de la terapia con linfocitos T, tal como las descritos en el presente documento. En un aspecto, se toma una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto generalmente sano. En determinados aspectos, los linfocitos T pueden expandirse, congelarse y utilizarse en un momento posterior. En determinados aspectos, las muestras se recogen de un paciente poco después del diagnóstico de una enfermedad particular (*p. ej.*, cáncer) como se describe en el presente documento, pero antes de cualquier tratamiento. En un aspecto adicional, las células se aíslan de una muestra de sangre o una aféresis de un sujeto antes de cualquier número de modalidades de tratamiento relevantes, incluyendo, pero sin limitación, quimioterapia, cirugía y/o radioterapia.

En determinados aspectos, los linfocitos T, se obtienen de un sujeto directamente después del tratamiento. A este respecto, se ha observado que tras determinados tratamientos de cáncer, en particular tratamientos con fármacos que dañan el sistema inmunitario, poco después del tratamiento durante el período en el que los pacientes normalmente se estarían recuperando del tratamiento, la calidad de los linfocitos T obtenidos puede ser óptima o puede mejorarse por su capacidad de expandirse *ex vivo*. Asimismo, tras la manipulación *ex vivo* utilizando los métodos descritos en el presente documento, estas células pueden estar en un estado preferido para mejorar el injerto y la expansión *in vivo*. Por lo tanto, se contempla dentro del contexto de la presente divulgación recoger células sanguíneas, incluyendo linfocitos T, células dendríticas u otras células del linaje hematopoyético, durante esta fase de recuperación. Además, en determinadas realizaciones, se pueden usar regímenes de movilización (por ejemplo, movilización con GM-CSF) y acondicionamiento para crear una condición en un sujeto en donde se favorece la repoblación, recirculación, regeneración y/o expansión de tipos celulares particulares, especialmente durante un período de tiempo definido después de la terapia. Los tipos de células ilustrativos incluyen linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas y otras células del sistema inmunitario.

Activación y expansión de linfocitos T

Ya sea antes o después de la modificación genética de los linfocitos T para expresar un CAR deseable (por ejemplo, un CAR descrito en el presente documento), los linfocitos T pueden activarse y expandirse generalmente usando métodos como los descritos, por ejemplo, en las patentes de los EE.UU. n.º 6.352.694; 6.534.055; 6.905.680; 6.692.964; 5.858.358; 6.887.466; 6.905.681; 7.144.575; 7.067.318; 7.172.869; 7.232.566; 7.175.843; 5.883.223; 6.905.874; 6.797.514; 6.867.041; y la publicación de patente de los EE.UU. n.º: 2006/0121005.

En diversos aspectos de la divulgación, los linfocitos T se expanden por contacto con una superficie que tiene unido a la misma un agente que estimula una señal asociada al complejo CD3/TCR y un ligando que estimula una molécula coestimuladora en la superficie de los linfocitos T. En particular, las poblaciones de linfocitos T pueden estimularse como se describe en el presente documento, tal como por contacto con un anticuerpo anti-CD3, o fragmento de unión a antígeno del mismo, o un anticuerpo anti-CD2 inmovilizado en una superficie, o por contacto con un activador de proteína cinasa C (por ejemplo, briostatina) junto con un ionóforo de calcio. Para la coestimulación de una molécula accesoria en la superficie de los linfocitos T, se puede utilizar un ligando que se una a la molécula accesoria. Por ejemplo, una población de linfocitos T puede ponerse en contacto con un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28, en condiciones apropiadas para estimular la proliferación de los linfocitos T. Para estimular la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o linfocitos T CD8⁺, un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Los ejemplos de un anticuerpo anti-CD28 incluyen 9.3, B-T3, XR-CD28 (Diación, Besancon, Francia), pueden utilizarse al igual que otros métodos comúnmente conocidos en la técnica (*véase, p. ej.*, Berg y col. (1998) Transplant Proc. 30(8): 3975-3977, 1998; Haanen y col. (1999) J. Exp. Med. 190(9): 1319-1328; Garland y col. (1999) J. Immunol Meth. 227(1-2): 53-63, y similares).

En determinados aspectos, la señal estimuladora primaria y la señal coestimuladora para el linfocito T pueden proporcionarse mediante protocolos diferentes. Por ejemplo, los agentes que proporcionan cada señal pueden estar en solución o acoplados a una superficie. Cuando se acopla a una superficie, los agentes pueden estar acoplados a la misma superficie (*es decir*, en formación "cis") o a superficies separadas (*es decir*, en formación "trans"). Como alternativa, un agente puede estar acoplado a una superficie y el otro agente en solución. En un aspecto, el agente que proporciona la señal coestimuladora está unido a una superficie celular y el agente que proporciona la señal de activación primaria está en solución o acoplado a una superficie. En determinados aspectos, ambos agentes pueden estar en solución. En otro aspecto, los agentes pueden estar en forma soluble y luego reticulados a una superficie, como una célula que expresa receptores Fc o un anticuerpo u otro agente de unión que se unirá a los agentes (*véase, p. ej.*, publicación de patente de los EE.UU. n.º 2004/0101519 y 2006/0034810 para células presentadoras de antígenos artificiales (aAPC) que se contemplan para su uso en la activación y expansión de linfocitos T en la presente divulgación).

En un aspecto, los dos agentes están inmovilizados sobre perlas, ya sea en la misma perla, es decir, "cis", o a perlas separadas, es decir, "trans". A modo de ejemplo, el agente que proporciona la señal de activación primaria es un anticuerpo anti-CD3 o un fragmento de unión a antígeno del mismo y el agente que proporciona la señal

coestimuladora es un anticuerpo anti-CD28 o un fragmento de unión a antígeno del mismo; y ambos agentes están coinmovilizados en la misma perla en cantidades moleculares equivalentes. En un aspecto, se usa una relación de 1:1 de cada anticuerpo unido a las perlas para la expansión de linfocitos T CD4⁺ y el crecimiento de linfocitos T. En determinados aspectos, se usa una relación de anticuerpos anti CD3:CD28 unidos a las perlas de tal manera que se observa un aumento en la expansión de linfocitos T en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En un aspecto particular, se observa un aumento de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 veces en comparación con la expansión observada usando una relación de 1:1. En un aspecto, la relación de anticuerpo CD3:CD28 unido a las perlas varía de 100:1 a 1:100 y todos los valores enteros intermedios. En un aspecto, se une más anticuerpo anti-CD28 a las partículas que anticuerpo anti-CD3, es decir, la relación de CD3:CD28 es menor de uno. En determinadas realizaciones, la relación de anticuerpo anti CD28 a anticuerpo anti CD3 unido a las perlas es superior a 2:1. En un aspecto particular, se utiliza una relación de CD3:CD28 de 1:100 de anticuerpo unido a perlas. En otro aspecto, se utiliza una relación de CD3:CD28 de 1:75 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto adicional, se utiliza una relación de CD3:CD28 de 1:50 de anticuerpo unido a perlas. En otro aspecto, se utiliza una relación de CD3:CD28 de 1:30 de anticuerpo unido a perlas. En un aspecto preferido, se utiliza una relación de CD3:CD28 de 1:10 de anticuerpo unido a perlas. En otro aspecto, se utiliza una relación de CD3:CD28 de 1:3 de anticuerpo unido a las perlas. En otro aspecto más, se utiliza una relación de CD3:CD28 de 3:1 de anticuerpo unido a las perlas.

En ciertos aspectos, se pueden usar relaciones de partículas a células de 1:500 a 500:1 y cualquier valor entero intermedio para estimular los linfocitos T u otras células diana. Como pueden apreciar los expertos en la materia, la relación de partículas a células puede depender del tamaño de las partículas con respecto a la célula diana. Por ejemplo, las perlas de tamaño pequeño solo pueden unir unas pocas células, mientras que perlas más grandes podrían unir muchas. En determinados aspectos, la relación de células a partículas varía de 1:100 a 100:1 y cualquier valor entero intermedio y en aspectos adicionales la relación comprende de 1:9 a 9:1 y cualquier valor entero intermedio, también puede usarse para estimular linfocitos T. La relación de partículas acopladas a anti-CD3 y anti-CD28 con respecto a los linfocitos T que dan como resultado la estimulación de los linfocitos T, puede variar como se señaló anteriormente, sin embargo, determinados valores preferidos incluyen 1:100, 1:50, 1:40, 1:30, 1:20, 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1 y 15:1, siendo una relación preferida al menos 1:1 partículas por linfocito T. En un aspecto, se utiliza una relación de partículas a células de 1:1 o menos. En un aspecto particular, una relación preferida de partícula:célula es 1:5. En aspectos adicionales, la relación de partículas a células puede variar dependiendo del día de estimulación. Por ejemplo, en un aspecto, la relación de partículas a células es de 1:1 a 10:1 el primer día y se añaden partículas adicionales a las células cada día o cada dos días a partir de entonces durante hasta 10 días, en relaciones finales de 1:1 a 1:10 (basándose en el recuento de células el día de la adición). En un aspecto particular, la relación de partículas a células es de 1:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:5 en el tercer y quinto día de estimulación. En otro aspecto, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta una relación final de 1:1 el primer día y 1:5 el tercer y quinto día de estimulación. En otro aspecto, la relación de partículas a células es de 2:1 el primer día de estimulación y se ajusta a 1:10 en el tercer y quinto día de estimulación. En otro aspecto, las partículas se añaden diariamente o cada dos días hasta una relación final de 1:1 el primer día y 1:10 el tercer y quinto día de estimulación. Un experto en la materia apreciará que pueden ser adecuados una variedad de otras relaciones para su uso en la presente divulgación. En particular, las relaciones variarán dependiendo del tamaño de partícula y del tamaño y tipo de célula.

En determinados aspectos, las células, tal como linfocitos T, se combinan con perlas recubiertas de agente, posteriormente se separan las perlas y las células y después se cultivan las células. En un aspecto alternativo, antes del cultivo, las perlas recubiertas de agente y las células no se separan sino que se cultivan juntas. En un aspecto adicional, las perlas y las células se concentran primero mediante la aplicación de una fuerza, como una fuerza magnética, lo que da como resultado un aumento de unión de marcadores de la superficie celular, induciendo así la estimulación celular.

A modo de ejemplo, las proteínas de la superficie celular pueden unirse permitiendo que perlas paramagnéticas a las que están unidos anti-CD3 y anti-CD28 (3 x 28 perlas) entren en contacto con los linfocitos T. En un aspecto, las células (por ejemplo, 10⁴ a 10⁹ linfocitos T) y perlas (por ejemplo, perlas paramagnéticas DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T en una relación de 1:1) se combinan en un tampón, *p. ej.*, PBS (sin cationes divalentes como calcio y magnesio).

De nuevo, los expertos en la materia pueden apreciar fácilmente que se puede utilizar cualquier concentración celular. Por ejemplo, la célula diana puede ser muy rara en la muestra y comprender solo el 0,01 % de la muestra o la muestra completa (*es decir*, 100 %) puede comprender la célula diana de interés. Por consiguiente, cualquier número de célula está dentro del contexto de la presente divulgación. En determinados aspectos, puede ser deseable disminuir significativamente el volumen en el que se mezclan las partículas y las células (*es decir*, incrementar la concentración de células), para garantizar el máximo contacto de células y partículas. Por ejemplo, en un aspecto, se utiliza una concentración de aproximadamente 2 mil millones de células/ml. En otro aspecto, se utilizan más de 100 millones de células/ml. En un aspecto adicional, se utiliza una concentración de células de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 millones de células/ml. En otro aspecto más, se utiliza una concentración de células de 75, 80, 85, 90, 95 o 100 millones de células/ml. En aspectos adicionales, se pueden utilizar concentraciones de 125 o 150 millones de células/ml. El uso de altas concentraciones puede dar como resultado un aumento del rendimiento celular, activación celular y expansión celular. Además, el uso de altas concentraciones celulares permite una captura más eficiente de

células que pueden expresar débilmente antígenos diana de interés, como los linfocitos T CD28 negativos. Tales poblaciones de células pueden tener valor terapéutico y sería deseable obtenerlas en determinados aspectos. Por ejemplo, el uso de una alta concentración de células permite una selección más eficiente de linfocitos T CD8+ que normalmente tienen una expresión de CD28 más débil.

En un aspecto ilustrativo, la mezcla se puede cultivar durante varias horas (aproximadamente 3 horas) hasta aproximadamente 14 días o cualquier valor entero horario intermedio. En otro aspecto, la mezcla puede cultivarse durante 21 días. En un aspecto, las perlas y los linfocitos T se cultivan juntos durante aproximadamente ocho días. En otro aspecto, las perlas y los linfocitos T se cultivan juntos durante 2-3 días. También pueden desearse varios ciclos de estimulación de modo que el tiempo de cultivo de linfocitos T pueda ser de 60 días o más. Las condiciones apropiadas para el cultivo de linfocitos T incluyen un medio apropiado (por ejemplo, Minimal Essential Media o RPMI Media 1640 o, X-vivo 15, (Lonza)) que puedan contener factores necesarios para la proliferación y la viabilidad, incluyendo suero (por ejemplo, suero fetal bovino o humano), interleucina-2 (IL-2), insulina, IFN-gamma, IL-4, IL-7, GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-15, TGF- β y TNF- α o cualquier otro aditivo para el crecimiento de células conocido por el experto en la materia. Otros aditivos para el crecimiento de las células incluyen, pero sin limitación, tensioactivo, Plasmanate y agentes reductores tales como N-acetil-cisteína y 2-mercaptoetanol. En determinados aspectos, los medios pueden incluir RPMI 1640, AIM-V, DMEM, MEM, α -MEM, F-12, x-Vivo 15, X-Vivo 20 y similares. Optimizador, con aminoácidos añadidos, piruvato de sodio y vitaminas, ya sea sin suero o suplementado con una cantidad adecuada de suero (o plasma) o un conjunto definido de hormonas, y/o una cantidad de citocina(s) suficiente para el crecimiento y expansión de los linfocitos T. Antibióticos, *p. ej.*, penicilina y estreptomina, pueden incluirse únicamente en cultivos experimentales, no en cultivos de células que se van a infundir en un sujeto. Las células diana se mantienen en las condiciones necesarias para favorecer el crecimiento, por ejemplo, una temperatura adecuada (*p. ej.*, 37 °C) y la atmósfera (*p. ej.*, aire más el 5 % de CO₂).

Los linfocitos T que han sido expuestos a distintos tiempos de estimulación pueden presentar características diferentes. Por ejemplo, los productos típicos sanguíneos o de células mononucleares de sangre periférica con aféresis tienen una población de linfocitos T auxiliares (T_H, CD4⁺) que es mayor que la población de linfocitos T citotóxicos o supresores (T_c, CD8⁺). La expansión ex vivo de los linfocitos T mediante la estimulación de los receptores CD3 y CD28 produce una población de linfocitos T que antes de aproximadamente los días 8-9 consiste predominantemente en linfocitos T_H, mientras que después de aproximadamente los días 8-9, la población de linfocitos T comprende una población cada vez mayor de linfocitos T_c. Por consiguiente, dependiendo del fin del tratamiento, infundir a un sujeto una población de linfocitos T que comprende predominantemente linfocitos T_H puede ser ventajoso. Análogamente, si se ha aislado un subconjunto de linfocitos T específico de antígeno, puede resultar beneficioso ampliar este subconjunto hasta un mayor grado.

Además, adicionalmente a los marcadores CD4 y CD8, otros marcadores fenotípicos varían significativamente, pero en gran parte, reproduciblemente durante el curso del proceso de expansión celular. Por lo tanto, dicha reproducibilidad permite la capacidad de adaptar un producto de linfocitos T activados para fines específicos.

Aplicación terapéutica de los CAR

En diversas realizaciones se proporcionan células transducidas con un vector que codifica los CAR descritos en el presente documento, como se establece en las reivindicaciones. En una realización ilustrativa, se proporcionan linfocitos T transducidos con un vector lentiviral (LV), donde el LV codifica un CAR anti-ALPPL2 como se describe en el presente documento. Por lo tanto, en algunos casos, el linfocito T transducido puede provocar una respuesta de linfocitos T mediada por CAR.

En ciertos aspectos de la divulgación, se proporciona el uso de un CAR para redirigir la especificidad de un linfocito T primario a un antígeno tumoral. Por lo tanto, se divulgan métodos para estimular una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos T a una población de células diana o tejido en un mamífero que comprende la etapa de administrar al mamífero un linfocito T que expresa un CAR como se describe en el presente documento.

En determinados aspectos, se divulgan métodos de terapia celular, donde la terapia celular utiliza células (*p. ej.*, células inmunomoduladoras tales como linfocitos T) modificadas genéticamente para expresar un CAR como se describe en el presente documento y la célula que expresa CAR (*p. ej.*, linfocito T CAR) se infunde a un receptor que lo necesita. La célula infundida es capaz de destruir las células cancerosas en el receptor, particularmente células cancerosas que expresan ALPP y/o ALPPL2 (*p. ej.*, mesotelioma, cáncer de testículos, cáncer de endometrio y subconjuntos de cáncer de ovario, cánceres pancreático y de pulmón o microcítico). A diferencia de las terapias con anticuerpos, los linfocitos T CAR son capaces de replicarse *in vivo* lo que da como resultado una persistencia a largo plazo que puede conducir a un control sostenido del tumor.

En un aspecto de la divulgación, los linfocitos T CAR descritos en este documento pueden sufrir fuerte expansión de linfocitos T *in vivo* y pueden persistir durante un período prolongado de tiempo. En otro aspecto, los linfocitos T CAR descritos en este documento evolucionan hacia linfocitos T con memoria específica que pueden reactivarse para inhibir cualquier formación o crecimiento de tumores adicionales. Por ejemplo, en determinados aspectos, los linfocitos T CAR pueden sufrir fuerte expansión de linfocitos T *in vivo* y persisten en niveles altos durante un período prolongado

de tiempo en la sangre y la médula ósea y forman linfocitos T con memoria específica. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría en particular, los linfocitos T CAR pueden diferenciarse *in vivo* en un estado similar a la memoria central tras el encuentro y posterior eliminación de las células diana que expresan el antígeno sustituto.

5 Sin desear quedar ligado a ninguna teoría en particular, la respuesta de inmunidad antitumoral provocada por los linfocitos T modificados con CAR puede ser una respuesta inmunitaria activa o pasiva. Además, la respuesta inmunitaria mediada por CAR puede ser parte de un enfoque de inmunoterapia adoptiva en el que los linfocitos T modificados con CAR inducen una respuesta inmunitaria específica al resto de unión a antígeno en el CAR. Por ejemplo, las células CAR anti-ALPP/ALPPL2 provocan una respuesta inmunitaria específica contra las células cancerosas ALPPL2.

10 Los cánceres que pueden tratarse incluyen cualquier cáncer que exprese o sobreexpresen ALPP y/o ALPPL2 o un fragmento de los mismos al que se le haya asignado un anticuerpo M25ADLF, M25ADLFEG, M25ADLFDS, M25FYIA, M25FYIAEG, M25FYIADS, M25, M25EG, M25DS, M25AELF, M25AELFEG, M25AELFDS, M25ADL99P, M25ADL99G, M25ADS95R, M25ADD28G, M25ADS91G, M25ADY93H, M25ADYHSRLF, M25GRITSGFYGDwtLC, M25FSITSGFYGDwtLC, M253018IA, M253018LF, M25AD, M25ADX, ALPPL2rd3_1, ALPPL2rd3_2, M25AGIA, M25AGLF, M25ASIA, M25ASLF, M25ASwt, M25AVIA, M25AVLF, M25ALIA, M25ALLF, M25wtIA y/o M25wtLF.

15 Los cánceres que pueden tratarse incluyen tumores que no están vascularizados, o que aún no están sustancialmente vascularizados, así como tumores vascularizados. Los cánceres pueden comprender tumores no sólidos o pueden comprender tumores sólidos, o pueden comprender células cancerosas (por ejemplo, células madre cancerosas). Los tipos de cánceres que van a tratarse con los CAR de la invención incluyen, pero sin limitación a mesotelioma, cáncer de testículos, cáncer de endometrio y subconjuntos de cáncer de ovario, cánceres pancreático y de pulmón no microcítico.

20 En ciertos aspectos de la divulgación, los linfocitos T modificados con CAR descritos en el presente documento también pueden servir como un tipo de vacuna para inmunización *ex vivo* y/o terapia *in vivo* en un mamífero. En determinados aspectos, el mamífero es un mamífero no humano y en otros aspectos, el mamífero es un humano.

25 Con respecto a la inmunización *ex vivo*, al menos uno de los siguientes puede ocurrir *in vitro* antes de administrar la célula a un mamífero: i) expansión de las células, ii) introducción de un ácido nucleico que codifica un CAR en las células, y/o iii) crioconservación de las células.

30 Los procedimientos *ex vivo* son bien conocidos en la técnica y se analizan más detalladamente a continuación. Brevemente, las células se aíslan de un mamífero (preferiblemente un ser humano) y se modifican genéticamente (es decir, se transducen o se transfectan *in vitro*) con un vector que expresa un CAR divulgado en el presente documento. La célula modificada con CAR se puede administrar a un receptor mamífero para proporcionar un beneficio terapéutico. En determinados aspectos, la célula modificada con CAR puede ser autóloga con respecto al receptor. Como alternativa, las células pueden ser alogénicas, singénicas o xenogénicas con respecto al receptor.

35 Un procedimiento adecuado, pero no limitativo para la expansión *ex vivo* de células madre y progenitoras hematopoyéticas se describe en la patente de los EE.UU. n.º 5.199.942 y se puede aplicar a las células descritas en el presente documento. Se conocen en la técnica otros métodos adecuados y los métodos no se limitan a ningún método particular de expansión *ex vivo* de las células. Brevemente, en determinados aspectos, el cultivo *ex vivo* y la expansión de linfocitos T comprende: (1) recoger células madre y progenitoras hematopoyéticas CD34+ de un mamífero a partir de extracción de sangre periférica o explantes de médula ósea; y (2) expandir dichas células *ex vivo*. Además de los factores de crecimiento celular descritos en la patente de los EE.UU. n.º 5.199.942, otros factores como flt3-L, IL-1, IL-3 y ligando c-kit, pueden utilizarse para el cultivo y la expansión de las células.

40 En determinados aspectos, además de utilizar una vacuna basada en células en términos de inmunización *ex vivo*, también se divulgan composiciones y métodos para la inmunización *in vivo* para provocar una respuesta inmunitaria dirigida contra células que presentan ALPP y/o ALPPL2 en un sujeto.

45 En diversos aspectos, las células modificadas con CAR descritas en el presente documento se pueden administrar solas o como una composición farmacéutica en combinación con diluyentes y/o con otros componentes tales como IL-2 u otras citocinas o poblaciones celulares. Brevemente, en determinados aspectos, las composiciones farmacéuticas pueden comprender una población de células diana como se describe en el presente documento, en combinación con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticos o fisiológicamente aceptables. Tales composiciones pueden comprender tampones tales como solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato y similares; hidratos de carbono tal como glucosa, manosa, sacarosa o dextranos, manitol; proteínas; polipéptidos o aminoácidos tales como glicina; antioxidantes; agentes quelantes tales como EDTA o glutatión; adyuvantes (*p. ej.*, hidróxido de aluminio); y conservantes. En determinadas realizaciones, las composiciones que comprenden células modificadas con CAR se formulan para administración intravenosa.

60 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden administrar de una manera apropiada para la enfermedad a tratar (o prevenir). La cantidad y frecuencia de la administración estarán determinadas por factores tales

como el estado del paciente y el tipo y gravedad de la enfermedad del paciente, aunque las dosis apropiadas pueden determinarse mediante ensayos clínicos.

Si se indica "una cantidad inmunológicamente eficaz", "una cantidad eficaz antitumoral", "una cantidad eficaz inhibidora de tumor", o "cantidad terapéutica", la cantidad precisa de las composiciones de la presente invención a administrar puede ser determinada por un médico teniendo en cuenta las diferencias individuales de edad, peso, tamaño del tumor, extensión de la infección o metástasis y estado del paciente (sujeto). Generalmente se puede afirmar que una composición farmacéutica que comprende los linfocitos T descritos en el presente documento se puede administrar en una dosificación de 10^4 a 10^9 células/kg de peso corporal, preferiblemente de 10^5 a 10^6 células/kg de peso corporal, incluyendo todos los valores enteros dentro de esos intervalos. Las composiciones de linfocitos T también se pueden administrar múltiples veces a estas dosificaciones. Las células se pueden administrar usando técnicas de infusión que se conocen comúnmente en inmunoterapia (véase, *p. ej.*, Rosenberg y col. (1988) New Eng. J. Med. 319: 1676). Un experto en la materia de la medicina puede determinar fácilmente la dosificación y el régimen de tratamiento óptimos para un paciente particular monitorizando al paciente para detectar signos de enfermedad y ajustando el tratamiento en consecuencia.

En determinados aspectos, puede desearse administrar linfocitos T activados a un sujeto y entonces posteriormente volver a extraer sangre (o realizar una aféresis), activar los linfocitos T de ésta como se describe en el presente documento, y reinfundir al paciente estos linfocitos T activados y expandidos. En determinados aspectos, este proceso se puede realizar varias veces cada pocas semanas. En determinados aspectos, los linfocitos T se pueden activar a partir de extracciones de sangre de 10 cc a 400 cc. En determinados aspectos, los linfocitos T se activan a partir de extracciones de sangre de 20 cc, 30 cc, 40 cc, 50 cc, 60 cc, 70 cc, 80 cc, 90 cc o 100 cc. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, el uso de este protocolo de extracción de sangre múltiple/reinfusión múltiple puede servir para seleccionar ciertas poblaciones de linfocitos T.

La administración de las composiciones en cuestión se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente, incluyendo por inhalación de aerosoles, inyección, ingestión, transfusión, implantación o trasplante. Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse a un paciente por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía intratumoral, por vía intranodal, por vía intramedular, por vía intramuscular, mediante inyección intravenosa (i.v.) o por vía intraperitoneal. En un aspecto, las composiciones de linfocitos T de la presente divulgación se administran a un sujeto mediante inyección intradérmica o subcutánea. En otro aspecto, las composiciones de linfocitos T de la presente divulgación se administran preferiblemente mediante inyección i.v. En determinados aspectos, las composiciones de linfocitos T pueden inyectarse directamente en un tumor, ganglio linfático o sitio de infección.

La dosificación de los tratamientos anteriores que van a administrarse a un sujeto variará según la naturaleza precisa de la afección que se esté tratando y el receptor del tratamiento. El ajuste de dosificaciones para administración humana se puede realizar según prácticas aceptadas en la técnica.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Ejemplo 1

Anteriormente hemos utilizado la selección de bibliotecas de presentación de anticuerpos en fagos sustractivos para identificar anticuerpos monoclonales humanos que se unen con alta especificidad a células tumorales vivas y células tumorales *in situ* residiendo en su microentorno tisular natural. En nuestro trabajo sobre el mesotelioma, una enfermedad huérfana incurable, identificamos un anticuerpo novedoso que se une específicamente a líneas celulares y tejidos de mesotelioma, pero no a ninguna otra línea celular estudiada.

Para caracterizar aún más la expresión del antígeno diana en tejidos normales, marcamos con biotina la IgG1 derivada del scFv y teñimos el panel estándar de la FDA de tejidos humanos normales para la evaluación de anticuerpos terapéuticos que contiene 90 núcleos (triplicados) de 30 órganos. No encontramos tinción para todos los tejidos humanos normales, excepto los trofoblastos placentarios (Tabla 2).

Tabla 2. Inmunohistoquímica (IHC) en tejido humano normal. N: sin tinción o sin cambio de tinción en comparación con el control secundario únicamente. ++++: tinción fuerte. En el estudio se utilizó IgG1 de M25 marcada con biotina.

Nombre del tejido	Tinción	Nombre del tejido	Tinción	Nombre del tejido	Tinción
Ganglio linfático	N	Ovario	N	Intestino delgado	N
Músculo esquelético	N	Páncreas	N	Nervio periférico	N
Próstata	N	Glándula salival	N	Útero	N
Riñón	N	Glándula pituitaria	N	Cerebelo	N
Hígado	N	Placenta	++++	Cerebro	N
Pulmón	N	Piel	N	Testículo	N

Estómago	N	Médula espinal	N	Timo	N
Esófago	N	Bazo	N	Glándula tiroidea	N
Corazón	N	Colon	N	Uréter	N
Cuello uterino	N	Músculo liso	N		

Esta exquisita especificidad nos impulsó a identificar el antígeno diana mediante inmunoprecipitación y espectrometría de masas. El antígeno se identificó como ALPPL2 y se confirmó mediante expresión ectópica del ADNc de ALPPL2 en una línea celular diana negativa (HEK293a). ALPPL2 es un miembro de la familia de la fosfatasa alcalina (AP), que consiste en dos isoformas estrechamente relacionadas expresadas en trofoblastos placentarios (ALPPL2 y ALPP) y dos miembros ampliamente expresados ALPL (tejido no específico, hígado/hueso/riñón) y ALPI (intestinal). Nuestro anticuerpo M25 se une específicamente a ALPPL2 (y ALPP) expresado en placenta, pero no a ALPL y ALPI que se expresan fuera de la placenta.

De forma interesante, nuestros datos preliminares de FACS competitivo que utilizan antígenos solubles sugieren que nuestro anticuerpo se une preferentemente a la forma de la superficie celular, potencialmente aliviando algunas de las preocupaciones sobre la eliminación de antígenos. Mientras este fenómeno está bajo investigación, sin comprometerse a una teoría particular, se cree que ALPPL2 existe como un dímero estable en la superficie celular (una propiedad común de la familia AP), pero menos en solución debido a la falta de asociación de membrana que estabilice la interacción monómero-monómero que de otro modo sería débil, lo que conduce a una unión preferencial basada en la aversez de nuestro anticuerpo a ALPPL2 de membrana. Cabe señalar que nuestro anticuerpo se seleccionó de bibliotecas de presentación en fago en células tumorales vivas, a diferencia de las proteínas solubles recombinantes, por tanto, puede que no sea del todo sorprendente que el anticuerpo posea esta propiedad novedosa.

La identificación del antígeno nos permitió realizar estudios de inmunohistoquímica (IHC) en tejidos tumorales incluidos en parafina. Encontramos que el antígeno se expresa ampliamente en el mesotelioma, cáncer de testículos, cáncer de endometrio y subconjuntos de cáncer de ovario, cánceres pancreático y de pulmón no microcítico. También generamos una molécula de fusión de dominio extracelular recombinante (ECD)-Fc y la usamos para seleccionar anticuerpos adicionales de alta afinidad mediante FACS a partir de una biblioteca de presentación de anticuerpos en levadura enriquecidos con aglutinantes de superficie celular, recién creada. Hemos identificado una variante de M25, M25AD, que se une a las células tumorales con una afinidad aparente de 28 p en su forma IgG1.

Se cree que la exquisita especificidad tumoral del antígeno diana y nuestro anticuerpo permite el desarrollo de terapia dirigida e inmunoterapia novedosas. Ya hemos desarrollado un ADC conjugando monometil auristatina F (MMAF) con IgG1 de M25AD y hemos demostrado actividad antitumoral *in vitro* (Figura 2) e *in vivo* (Figura 3). También construimos un ADC de M25AD utilizando monometil auristatina E (MMAE) y obtuvimos una potente inhibición de los xenoinjertos de mesotelioma *in vivo* a una dosis de 3 mg/kg (Figura 4).

Además de las células de mesotelioma, encontramos expresión de ALPPL2 en la superficie celular en algunas otras líneas celulares tumorales, incluida la línea de cáncer pancreático Capan-1 y la línea de cáncer de pulmón no microcítico H1661 (Figura 5), estando en curso el estudio sobre líneas de cáncer de ovario. Tanto M25AD-MMAF como M25AD-MMAE inhiben potentemente el crecimiento de líneas celulares de cáncer pancreático y de pulmón no microcítico *in vitro* (Figura 6). Pendiente de confirmación adicional *in vivo*, se cree que el ADC de anti-ALPPL2 novedoso y nuestra estrategia dirigida a ALPPL2 en general son aplicables a múltiples cánceres incurables con necesidades clínicas extremas.

Además de ADC, la alta especificidad tumoral del antígeno tumoral permite el desarrollo de diversas formas de inmunoterapia dirigida, *p. ej.*, un anticuerpo biespecífico que recluta y activa linfocitos T en sitios tumorales, así como otras plataformas tal como linfocitos T modificados con receptores de antígenos quiméricos (T-CAR) e inmunocitocinas.

En un ejemplo ilustrativo, no limitativo, se produce un anticuerpo biespecífico ALPPL2/CD3 novedoso. Debido al patrón de expresión altamente restringido del antígeno diana, se espera que la toxicidad en la diana sea mínima. Combinado con un alto nivel de expresión de antígenos en la superficie de las células tumorales, se espera una amplia ventana terapéutica. El agente biespecífico es un biológico puro, presentando una forma relativamente simple para el desarrollo y la fabricación.

En diversos ejemplos se contemplan dos candidatos a fármacos bioterapéuticos: (1) un ADC, para el que hemos realizado estudios preliminares y demostrado *in vitro* e *in vivo* actividad antitumoral. Se pueden probar cargas útiles adicionales, incluidos agentes quelantes de ADN y conectores, para optimizar el índice terapéutico y el mejor candidato puede avanzar a estudios que permitan IND. (2) Inmunoterapia dirigida en forma de un anticuerpo humano biespecífico contra el antígeno tumoral específico ALPPL2 y el receptor de linfocitos T CD3.

La exquisita especificidad tumoral de ALPPL2 presenta una excelente oportunidad para desarrollar un ADC novedoso con el potencial de lograr respuestas duraderas en la clínica como agente único. Además de los derivados de auristatina con los que ya hemos obtenido resultados preclínicos prometedores, se pueden utilizar ojivas más potentes como PBD (o fármacos con potencia similar) para construir ADC novedosos. Se pueden realizar estudios de

dosificación *in vivo* utilizando xenoinjertos de mesotelioma, cáncer pancreático, cáncer de pulmón no microcítico y cáncer de ovario.

- 5 Además, se contempla un anti-ALPPL2/CD3 biespecífico para la activación inmunitaria específica de tumores. Se puede crear un agente biespecífico anti-ALPPL2/CD3 utilizando plataformas DART o BiTE. Blinatumomab es un agente terapéutico BiTE aprobado por la FDA y su secuencia scFv anti-CD3 está disponible y puede usarse como referencia para el estándar actual. Los scFv anti-CD3 aislados mediante selección y cribado adicionales pueden compararse con este estándar actual.
- 10 Además, en ciertos ejemplos se contempla un biomarcador basado en IHC que permite la evaluación de los niveles de expresión de antígenos para la estratificación del paciente. Por ejemplo, un ensayo de biomarcadores basado en ELISA puede permitir la evaluación del estado del tumor mediante una prueba basada en suero.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo que se une específicamente a ALPPL2 humana expresada en placenta expuesta en SEQ ID NO:2, en donde dicho anticuerpo comprende al menos una región variable de cadena pesada (VH) y al menos una región variable de cadena ligera (VL), en donde:

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYA (residuos 26-33 de SEQ ID NO:6), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:6) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 6) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:6), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO: 6), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTIASLTVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:6) del anticuerpo M25FYIA expuesto en SEQ ID NO:6; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYD (residuos 26-33 de SEQ ID NO:3), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:3) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 3) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:3), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:3), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTSTSTFVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:3) del anticuerpo M25ADLF expuesto en SEQ ID NO:3; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYD (residuos 26-33 de SEQ ID NO:4), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYEGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:4), y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO:4) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:4), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:4), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTSTSTFVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:4) del anticuerpo M25ADLFEG expuesto en SEQ ID NO:4; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYD (residuos 26-33 de SEQ ID NO:5), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDSSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:5) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 5) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:5), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:5), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTSTSTFVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:5) del anticuerpo M25ADLFDS expuesto en SEQ ID NO:5; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYA (residuos 26-33 de SEQ ID NO: 7), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYEGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:7), y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO:7) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:7), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO: 7), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTIASLTVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:7) del anticuerpo M25FYIAEG expuesto en SEQ ID NO:7; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYA (residuos 26-33 de SEQ ID NO:8), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDSSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:8) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 8) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:8), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:8), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTIASLTVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:8) del anticuerpo M25FYIADS expuesto en SEQ ID NO:8; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYA (residuos 26-33 de SEQ ID NO:9), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:9) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 9) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:9), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:9), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTSTSTLTVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:9) del anticuerpo M25 expuesto en SEQ ID NO:9; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYA (residuos 26-33 de SEQ ID NO:10), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYEGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:10) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 10) y un dominio ligero variable

secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:35) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 35) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:35), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:35), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTIASLTVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:35) del anticuerpo M25AVIA expuesto en SEQ ID NO:35; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYV (residuos 26-33 de SEQ ID NO:36), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:36) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 36) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:36), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:36), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTSTSTFVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:36) del anticuerpo M25AVLF expuesto en SEQ ID NO:36; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYL (residuos 26-33 de SEQ ID NO:37), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:37) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 37) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:37), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:37), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTIASLTVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:37) del anticuerpo M25ALIA expuesto en SEQ ID NO:37; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYL (residuos 26-33 de SEQ ID NO:38), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:38) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 38) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:38), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:38), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTSTSTFVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:38) del anticuerpo M25ALLF expuesto en SEQ ID NO:38; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYA (residuos 26-33 de SEQ ID NO:39), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:39) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 39) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:39), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:39), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTIASLTVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:39) del anticuerpo M25wtIA expuesto en SEQ ID NO:39; o

dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYA (residuos 26-33 de SEQ ID NO:40), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:40) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 40) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:40), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO:40), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTSTSTFVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:40) del anticuerpo M25wtLF expuesto en SEQ ID NO:40.

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo comprende un dominio pesado variable que comprende CDR1 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos GFTFSSYA (residuos 26-33 de SEQ ID NO:6), CHD2 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos ISYDGSNK (residuos 51-58 de SEQ ID NO:6) y CDR3 de VH que consiste en la secuencia de aminoácidos AKEGDSSRWSYDL (residuos 97-109 de SEQ ID NO: 6) y un dominio ligero variable que comprende CDR1 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSDVGGYNY (residuos 161-169 de SEQ ID NO:6), CHD2 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos DVT (residuos 187-189 de SEQ ID NO: 6), y CDR3 de VL que consiste en la secuencia de aminoácidos SSYTIASLTVV (residuos 226-236 de SEQ ID NO:6) del anticuerpo M25FYIA expuesto en SEQ ID NO:6.

3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde:

dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo M25FYIA donde la secuencia de aminoácidos de dicha región VH consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos 1-120 de SEQ ID NO:6 y la secuencia de aminoácidos de dicha región VL consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos 136-246 de SEQ ID NO:6; o

dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo M25ADLF donde la secuencia de aminoácidos de dicha región VH consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos 1-120 de SEQ ID NO:3 y la secuencia de aminoácidos de dicha región VL consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos 136-247 de SEQ ID NO:3; o

[illegible]

dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo M25ALLF donde la secuencia de aminoácidos de dicha región VH consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos 1-120 de SEQ ID NO:38 y la secuencia de aminoácidos de dicha región VL consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos 136-247 de SEQ ID NO:38; o

dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo M25wtIA donde la secuencia de aminoácidos de dicha región VH consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos 1-120 de SEQ ID NO:39 y la secuencia de aminoácidos de dicha región VL consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos 136-246 de SEQ ID NO:39; o

dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo M25wtLF donde la secuencia de aminoácidos de dicha región VH consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos 1-120 de SEQ ID NO:40 y la secuencia de aminoácidos de dicha región VL consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos 136-247 de SEQ ID NO:40.

4. El anticuerpo de la reivindicación 3, en donde dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo M25FYIA donde la secuencia de aminoácidos de dicha región VH consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos 1-120 de SEQ ID NO:6 y la secuencia de aminoácidos de dicha región VL consiste en la secuencia de aminoácidos de los residuos 136-246 de SEQ ID NO:6;

5. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde:

dicho anticuerpo es una inmunoglobulina intacta (p. ej., una IgG, una IgA o una IgE),
dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a células que expresan ALPP y/o ALPPL2; y/o

dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo que se une específicamente a células que expresan ALPP y/o ALPPL2 y un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en Fv, Fab, (Fab')₂, (Fab')₃, IgGΔCH2 y un minicuerpo; y/o

dicho anticuerpo comprende un anticuerpo de cadena sencilla; y/o

dicho anticuerpo es scFv humano; y/o

dicho anticuerpo es un scFv humano en donde la región variable de cadena pesada está unida a la región variable de cadena ligera mediante un conector que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos (Gly₄Ser)₃ expuesta en SEQ ID NO: 1.

6. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho anticuerpo es una inmunoglobulina intacta.

7. El anticuerpo de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.

8. Un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 unido a un efector, en donde dicho efector se selecciona del grupo que consiste en un segundo anticuerpo, un marcador detectable, una citotoxina o un agente citostático (fármaco), un liposoma que contiene un fármaco, un radionúclido, un fármaco, un profármaco, un inmunomodulador, una partícula vírica, una citocina, un segundo anticuerpo y un quelato.

9. El inmunoconjugado de la reivindicación 8, en donde:

dicho fármaco es un fármaco antineoplásico;

dicho fármaco se selecciona del grupo que consiste en un inhibidor microtubular, agentes que dañan el ADN y un inhibidor de la polimerasa;

dicho fármaco comprende un inhibidor de tubulina;

dicho fármaco comprende un inhibidor de tubulina seleccionado del grupo que consiste en una auristatina, dolastatina-10, derivados sintéticos del producto natural dolastatina-10 y maitansina o un derivado de maitansina; o

dicho fármaco comprende un inhibidor de tubulina seleccionado del grupo que consiste en monometilauristatina F (MMAF), auristatina E (AE), monometilauristatina E (MMAE), vcMMAE y vcMMAF; o

dicho fármaco comprende un inhibidor de tubulina que comprende una maitansina seleccionada del grupo que consiste en mertansina (DM1), DM3 y DM4; o

dicho fármaco comprende un agente que daña el ADN; o

dicho fármaco comprende un agente que daña el ADN seleccionado del grupo que consiste en una caliqueamicina, una duocarmicina y pirrolobenzodiazepinas,

dicho fármaco comprende un agente que daña el ADN que comprende una caliqueamicina o un análogo de caliqueamicina; o

dicho fármaco comprende un agente que daña el ADN que comprende una duocarmicina; o

dicho fármaco comprende un agente que daña el ADN que comprende una duocarmicina, seleccionada del grupo que consiste en duocarmicina A, duocarmicina B1, duocarmicina B2, duocarmicina C1, duocarmicina C2, duocarmicina D, duocarmicina SA, ciclopropilbenzoindol duocarmicina (CC-1065), centanamicina, raquelmicina, adozelesina, bizelesina y carzelesina; o

dicho fármaco comprende un agente que daña el ADN que es una pirrolobenzodiazepina o un dímero de

pirrolobenzodiazepina; o

dicho fármaco comprende un agente que daña el ADN seleccionado del grupo que consiste en antramycin (y dímeros de la misma), mazetramycin (y dímeros de la misma), tomamycin (y dímeros de la misma), protractarcin (y dímeros de la misma), quicamycin (y dímeros de la misma), neotramycin A (y dímeros de la misma), neotramycin B (y dímeros de la misma), DC-81 (y dímeros del mismo), sibiromycin (y dímeros de la misma), porotramycin A (y dímeros de la misma), porotramycin B (y dímeros de la misma), sibanomycin (y dímeros de la misma), abeimycin (y dímeros de la misma), SG2000 y SG2285; o

dicho fármaco se selecciona del grupo que consiste en auristatina, dolastatina, colchicina, combretastatina e inhibidores de mTOR/PI3K; o

dicho fármaco se selecciona del grupo que consiste en fluorouracilo (5-FU), capecitabina, 5-trifluorometil-2'-desoxiuridina, metotrexato sódico, raltitrexed, pemetrexed, arabinósido de citosina, 6-mercaptopurina, azatioprina, 6-tioguanina (6-TG), pentostatina, fosfato de fludarabina, cladribina, floxuridina (5-fluoro-2), inhibidor de la ribonucleótido reductasa (RNR), ciclofosfamida, neosar, ifosfamida, tiotepa, 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU), 1, -(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosourea, metilo (CCNU), hexametilmelamina, busulfán, procarbazona HCl, dacarbazina (DTIC), clorambucilo, melfalán, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, bendamustina, carmustina, clorometina, dacarbazina (DTIC), fotemustina, lomustina, manosulfán, nedaplatino, nimustina, prednimustina, ranimustina, satraplatino, semustina, estreptozocina, temozolomida, treosulfano, triazicuona, trietilenmelamina, tioTEPA, triplatin tetranitrato, trofosfamida, uramustina, doxorubicina, citrato de daunorrubicina, mitoxantrona, actinomicina D, etopósido, topotecán HCl, tenipósido (VM-26), irinotecán HCl (CPT-11), camptotecina, belotecán, rubitecán, vincristina, sulfato de vinblastina, tartrato de vinorelbina, sulfato de vindesina, paclitaxel, docetaxel, nanopartículas de paclitaxel abraxano, ixabepilona, larotaxel, ortataxel, tesetaxel, vinflunina, ácido retinoico, un derivado del ácido retinoico, doxorubicina, vinblastina, vincristina, ciclofosfamida, ifosfamida, cisplatino, 5-fluorouracilo, un derivado de camptotecina, interferón, tamoxifeno y taxol; o

dicho fármaco antineoplásico se selecciona del grupo que consiste en abraxano, doxorubicina, pamidronato disódico, anastrozol, exemestano, ciclofosfamida, epirubicina, toremifeno, letrozol, trastuzumab, megestroltamoxifeno, paclitaxel, docetaxel, capecitabina, acetato de goserelina y ácido zoledrónico; o

dicho anticuerpo está unido a una citotoxina; o

dicho anticuerpo está unido a una citotoxina seleccionada del grupo que consiste en una toxina de Diphtheria, una exotoxina de Pseudomonas, una ricina, una abrina, saporina y una timidina cinasa; o

dicho anticuerpo está unido a un inmunomodulador; o

dicho anticuerpo está unido a un inmunomodulador donde el inmunomodulador comprende un segundo anticuerpo; dicho anticuerpo está unido a un inmunomodulador donde el inmunomodulador comprende un anticuerpo anti-CD3;

dicho anticuerpo está unido a un inmunomodulador donde el inmunomodulador comprende un inmunomodulador que bloquea los puntos de control inmunitarios;

dicho anticuerpo está unido a un inmunomodulador donde el inmunomodulador comprende un anticuerpo que se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-CTLA4, un anticuerpo anti-PDL1, un anticuerpo anti-PDL2, un anticuerpo anti-ICOS y un anticuerpo anti-BTLA;

dicho anticuerpo está unido a un inmunomodulador donde el inmunomodulador es un anticuerpo que comprende los dominios VH y VL de un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en ipilimumab, nivolumab y pembrolizumab; o

dicho anticuerpo está unido a un inmunomodulador donde el inmunomodulador es un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en ipilimumab, nivolumab y pembrolizumab; o

dicho anticuerpo está unido a un quelato que comprende un isótopo seleccionado del grupo que consiste ⁹⁹Tc, ⁹⁹Tc, ⁹⁷Ru, ⁹⁵Ru, ⁹⁴Tc, ⁹⁰Y, ⁹⁰Y, ⁸⁹Zr, ⁸⁶Y, ⁷⁷Br, ⁷⁷As, ⁷⁶Br, ⁷⁵Se, ⁷²As, ⁶⁸Ga, ⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁷Ga, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Cu, ⁶⁴Cu, ⁶²Cu, ⁶²Cu, ⁵⁹Fe, ⁵⁸Co, ⁵⁷Co, ⁵²Mn, ⁵²Fe, ⁵¹Cr, ⁴⁷Sc, ³H, ³⁵S, ³³P, ³²P, ²²⁵Ac, ²²⁴Ac, ²²³Ra, ²¹³Bi, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ²¹¹At, ²⁰³Pb, ²⁰³Hg, ²⁰¹Tl, ¹⁹⁹Au, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁸Au, ¹⁹⁷Pt, ¹⁸F, ¹⁸⁹Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁶Re, ¹⁷⁷Lu, ¹⁷⁷Lu, ¹⁷⁵Yb, ¹⁷²Tm, ¹⁶⁹Yb, ¹⁶⁹Yb, ¹⁶⁹Er, ¹⁶⁸Tm, ¹⁶⁷Tm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁶⁶Dy, ¹⁶⁵Tm, ¹⁶⁵Dy, ¹⁶¹Tb, ¹⁵O, ¹⁵N, ¹⁵⁹Gd, ¹⁵⁷Gd, ¹⁵³Sm, ¹⁵³Pb, ¹⁵¹Pm, ¹⁴C, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴³Pr, ¹⁴²Pr, ¹³N, ¹³³I, ¹³¹I, ¹³¹I, ¹²⁷Te, ¹²⁶I, ¹²⁵Te, ¹²⁵I, ¹²⁴I, ¹²³I, ¹²²Te, ¹²¹Te, ¹²¹Sn, ¹¹C, ¹¹³In, ¹¹¹In, ¹¹¹In, ¹¹¹Ag, ¹¹¹Ag, ¹⁰⁹Pd, ¹⁰⁹Pd, ¹⁰⁷Hg, ¹⁰⁵Ru, ¹⁰⁵Rh, ¹⁰⁵Rh y ¹⁰³Ru.

10. El inmunoconjugado de la reivindicación 8, en donde

dicho efector comprende un inhibidor de tubulina seleccionado del grupo que consiste en monometilauristatina F (MMAF), auristatina E (AE), monometilauristatina E (MMAE), vcMMAE y vcMMAF.

11. Una formulación farmacéutica comprendiendo dicha formulación:

un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7; y/o

un vehículo farmacéuticamente aceptable y un inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10.

12. Un inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, donde:

el efector que comprende dicho inmunoconjugado tiene actividad citostática y/o citotóxica y/o actividad inmunomoduladora y el inmunoconjugado es para su uso en la reducción de células iniciadoras de tumores en una

población celular; o

el efector que comprende dicho inmunoconjugado comprende un marcador detectable y el inmunoconjugado es para su uso en la detección de una célula cancerosa de un cáncer que expresa ALPPL2.

- 5 13. Un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 y/o un inmunoconjugado anti-ALPPL2 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde el efector que comprende dicho inmunoconjugado tiene actividad citostática y/o citotóxica y/o actividad inmunomoduladora para su uso en el tratamiento de un cáncer caracterizado por la expresión de ALPPL2.
- 10 14. Un receptor de antígeno quimérico (CAR) que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 15 15. Una célula que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un receptor de antígeno quimérico (CAR), de acuerdo con la reivindicación 14.
16. Una célula modificada genéticamente para expresar un receptor de antígeno quimérico (CAR) de la reivindicación 14 para su uso:
 - 20 en un método para proporcionar una inmunidad antitumoral contra tumores que expresan ALPPL2, o una región de ALPPL2 unida por el anticuerpo M25AD, M25ADX y/o M25; o
 - en un método para tratar un mamífero con un cáncer que comprende células que expresan ALPPL2, o una región de ALPPL2 unida por el anticuerpo M25AD, M25ADX y/o M25; o
 - 25 en un método para tratar cáncer donde el método comprende poner en contacto la célula modificada mediante ingeniería genética con una célula cancerosa de un mamífero e inducir la apoptosis de la célula cancerosa.

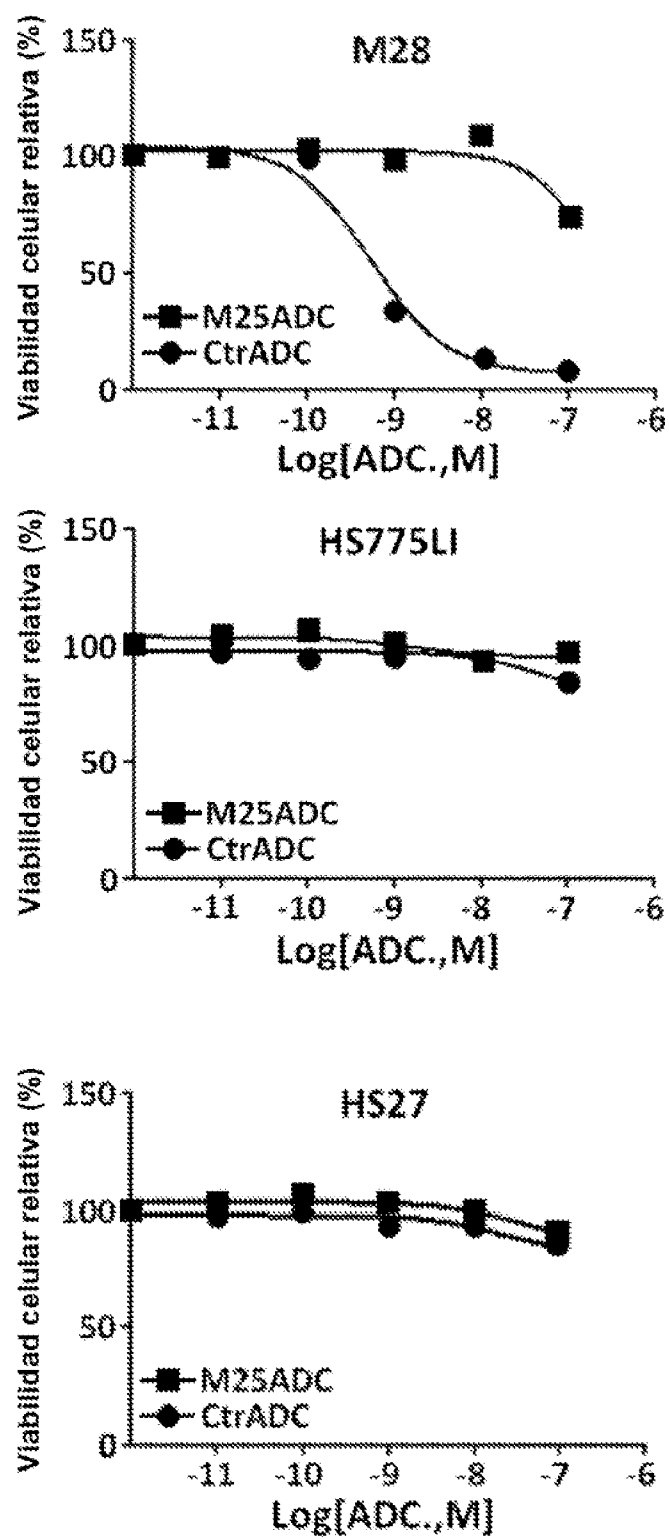
UniProtKB - P05187 ALPP

10	20	30	40	50
MLGPCMLLLL	LLLGLRLQLS	LGIIPVEEEN	PDFWNREAAE	ALGAAKKLQP
60	70	80	90	100
AQTAAKNLII	FLGDGMGVST	VTAARILKGQ	KKDKLGPEIP	LAMDREFPYVA
110	120	130	140	150
LSKTYNVDKH	VPDSGATATA	YLCGVKGNFQ	TIGLSAAARF	NQCNTTRGNE
160	170	180	190	200
VISVMNRACK	AGKSVGVT	TRVQHASPAG	TYAHTVNRNW	YSDADVFAASA
210	220	230	240	250
RQEGCQDIAT	QLISNMDIDV	ILGGGRKYM	RMGTFDPEYF	DDYSQGGTRL
260	270	280	290	300
DGKNLVQEWL	AKRQGARYVW	NRTLMQASL	DPSVTHLMGL	FEPGDMKYEI
310	320	330	340	350
HRDSTLDPSL	MEMTEAALRL	LSRNPRGFFL	FVEGGRIDHG	HHESRAYRAL
360	370	380	390	400
TETIMFDDAI	ERAGQLTSEE	DTLSLVTADH	SHVFSFGGYP	LRGSSIFGLA
410	420	430	440	450
PGKARDRKAY	TVLLYGNGPG	YVLKDGARPD	VTESESGSPE	YRQQSAVPLD
460	470	480	490	500
EETHAGEDVA	VFARGPQAH	VHGVQEQTFI	AHVMAFAACL	EPYTACDLAP
510	520	530		
PAGTTDAHP	GRSVVPALLP	LLAGTLLLLL	TATAP	

UniProtKB - P10696 ALPPL2

10	20	30	40	50
MQGPWVLLLL	GLRLQLSLGI	IPVEEENPDF	WNRQAAEALG	AAKKLQPAQT
60	70	80	90	100
AAKNLIIFLG	DGMGVSTVTA	ARILKGQKKD	KLGPETFLAM	DRFPYVALSK
110	120	130	140	150
TYSVDKHVPD	SGATATAYLC	GVKGNFQTIG	LSAAARFNQC	NTTRGNEVIS
160	170	180	190	200
VMNRACKAGK	SVGVVTTTRV	QHASPAGAYA	HTVNRNWYSD	ADVPASARQE
210	220	230	240	250
GCQDIATQLI	SNMDIDVILG	GGRKYMFFMG	TPDPEYPDDY	SQGGTRLGDK
260	270	280	290	300
NLVQEWLAKH	QGARYVWNRT	ELLQASLDPS	VTHLMGLFEP	GDMKYEIHRD
310	320	330	340	350
STLDPSLMEM	TEAALLLSR	NPRGFFLFVE	GGRIDHGHE	SRAYRALTET
360	370	380	390	400
IMFDDAIERA	GQLTSEEDTL	SLVTADHSHV	FSFGGYPLRG	SSIFGLAPGK
410	420	430	440	450
ARDRKAYTVL	LYGNGPGYVL	KDGARPDVTE	SESGSPEYRQ	QSAVPLDGET
460	470	480	490	500
HAGEDVAVFA	RGPQAHLVHG	VQEQTFFIAHV	MAFAACLEPY	TACDLAPRAG
510	520	530		
TTDAHPGPS	VVPALLPLLA	GTLLLLGTAT	AP	

Fig. 1

**Fig. 2**

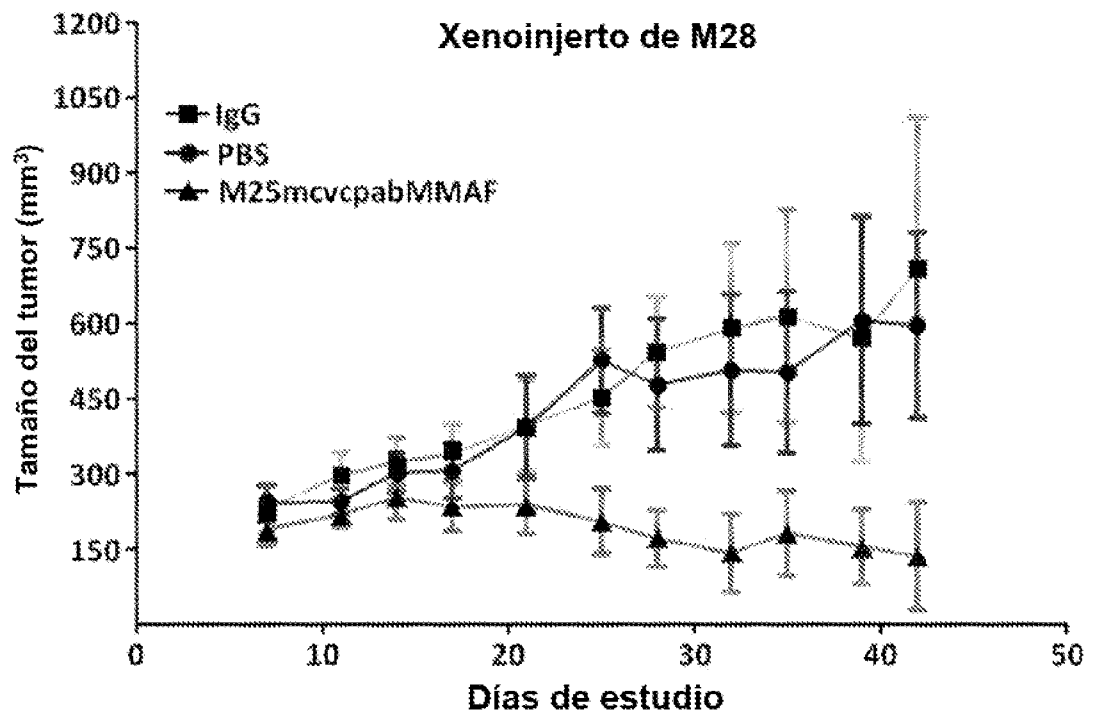


Fig. 3A

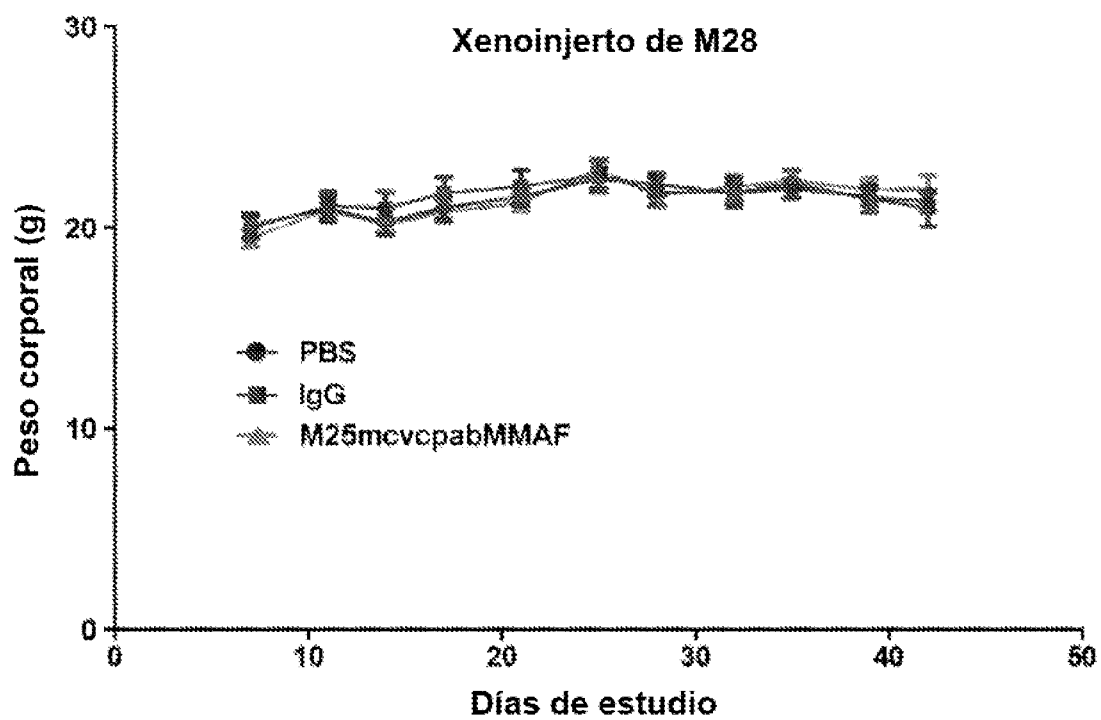


Fig. 3B

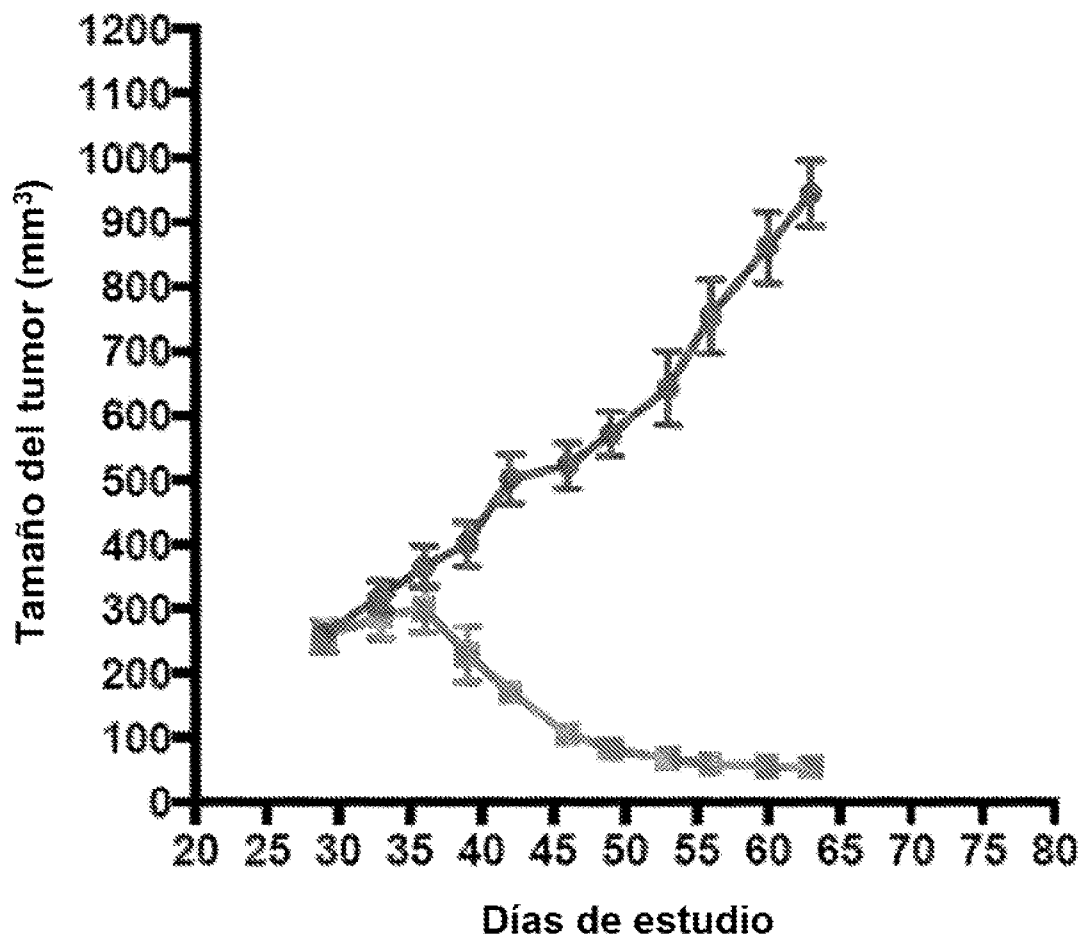


Fig. 4

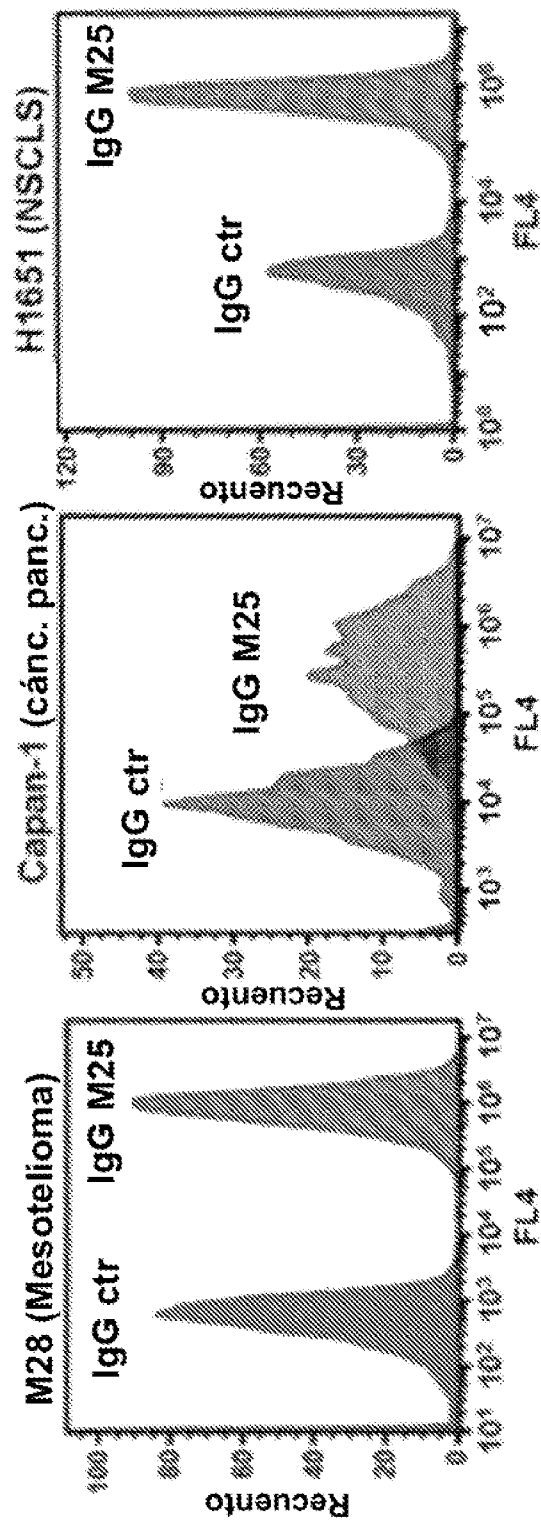
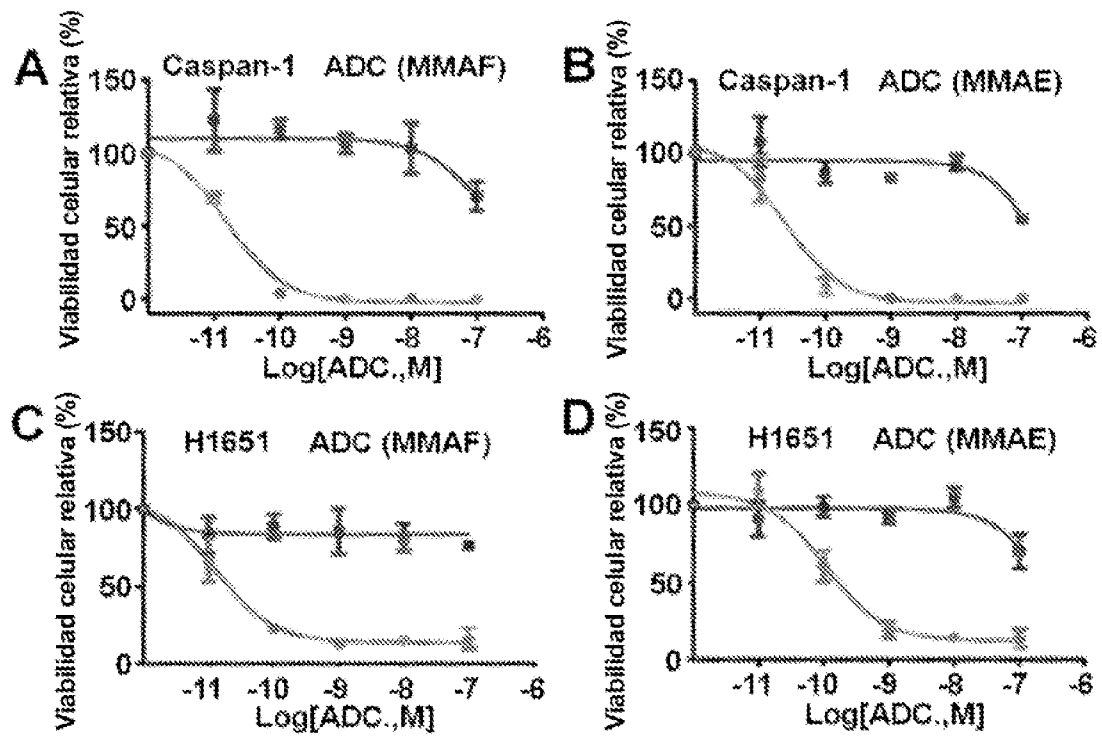


Fig. 5

**Fig. 6**

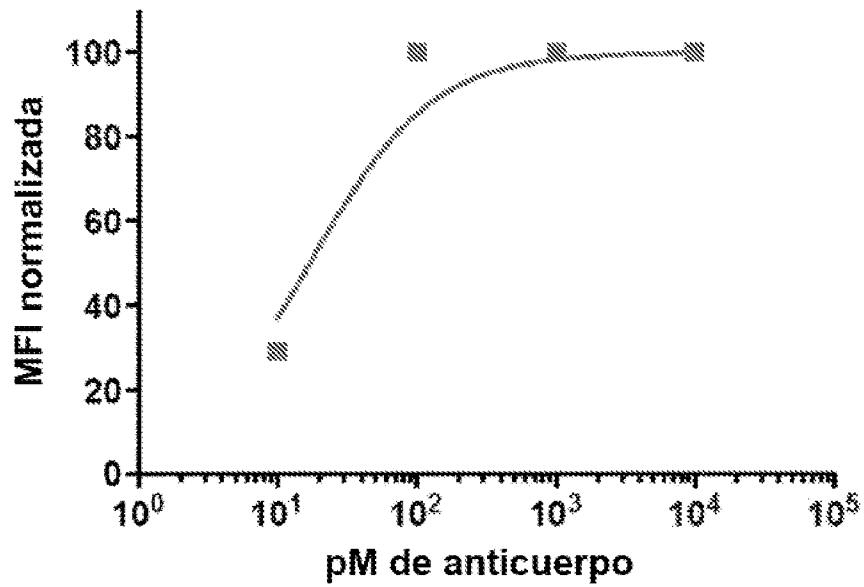


Fig. 7

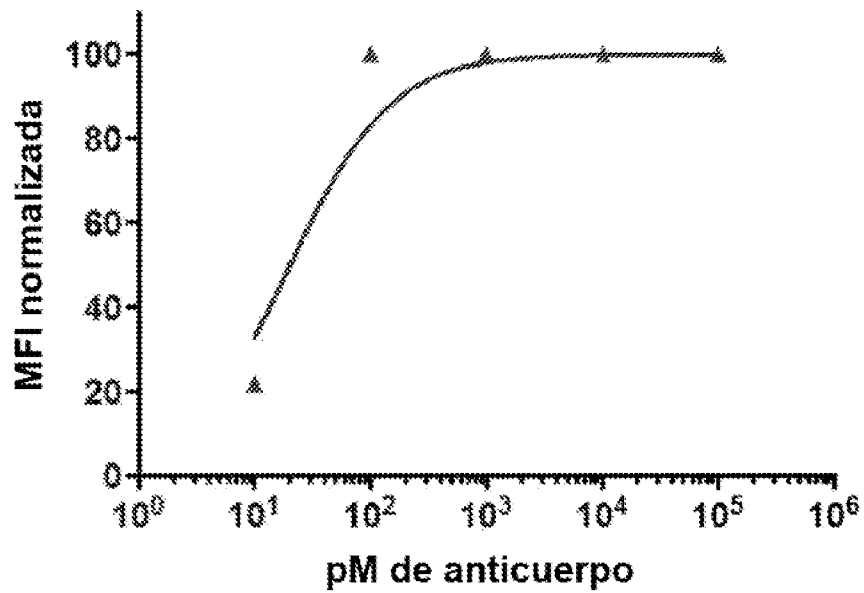


Fig. 8

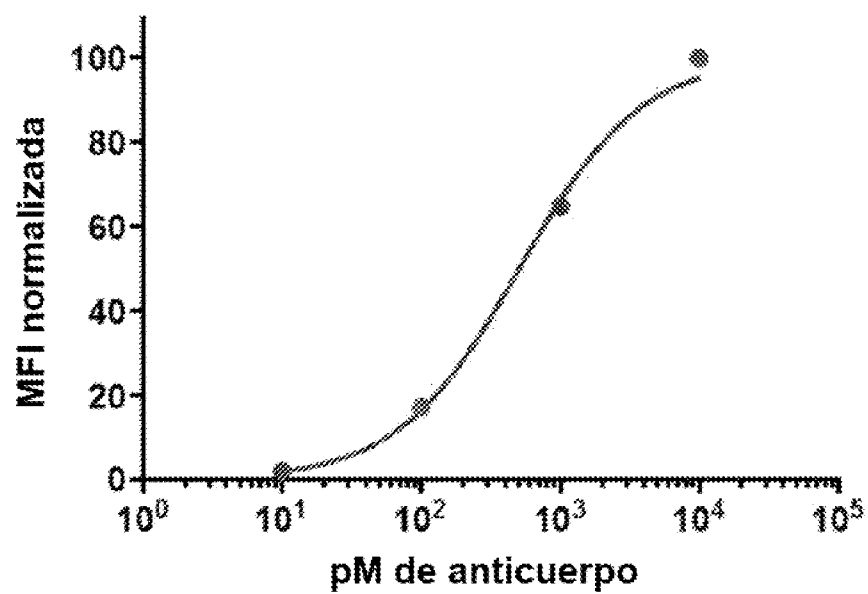


Fig. 9