

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 861 499**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2017 PCT/US2017/036445**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2017 WO17214335**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2017 E 17732657 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2020 EP 3458479**

54 Título: **Anticuerpos anti-B7-H3 y conjugados anticuerpo-fármaco**

30 Prioridad:

08.06.2016 US 201662347476 P

25.07.2016 US 201662366511 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.10.2021

73 Titular/es:

**ABBVIE INC. (100.0%)
1 North Waukegan Road
North Chicago, IL 60064, US**

72 Inventor/es:

**BENATUIL, LORENZO;
BRUNCKO, MILAN;
CHAO, DEBRA;
IZERADJENE, KAMEL;
JUDD, ANDREW, S.;
PHILLIPS, ANDREW, C.;
SOUERS, ANDREW, J. y
THAKUR, ARCHANA**

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 861 499 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-B7-H3 y conjugados anticuerpo-fármaco

5 Antecedentes de la invención

La proteína de homología 3 de B7 (B7-H3) (también conocida como CD276 y B7RP-2, y denominada en la presente descripción como "B7-H3") es una glicoproteína transmembrana de tipo I de la superfamilia de las inmunoglobulinas. La B7-H3 humana contiene un péptido señal putativo, dominios de Ig tipo V y tipo C, una región transmembrana y un dominio citoplásmico. La duplicación de exones en humanos da como resultado la expresión de dos isoformas de B7-H3 que tienen un solo dominio tipo IgV-IgC (isoforma 2IgB7-H3) o un dominio tipo IgV-IgC-IgV-IgC (isoforma 4IgB7-H3) que contiene residuos conservados de cisteína. La isoforma B7-H3 predominante en tejidos y líneas celulares humanas es la isoforma 4IgB7-H3 (Steinberger y otros, J. Immunol. 172(4): 2352-9 (2004)).

Se ha informado que B7-H3 tiene funciones de señalización tanto coestimuladoras como coinhibidoras (véase, por ejemplo, Chapoval y otros, Nat. Immunol. 2: 269-74 (2001); Suh y otros, Nat. Immunol. 4: 899-906 (2003); Prasad y otros, J. Immunol. 173: 2500-6 (2004); y Wang y otros, Eur. J. Immunol. 35: 428-38 (2005)). Por ejemplo, los estudios *in vitro* han demostrado la función coestimuladora de B7-H3 ya que B7-H3 fue capaz de aumentar la proliferación de linfocitos T citotóxicos (CTL) y regular positivamente la producción de interferón gamma (IFN- γ) en presencia de anticuerpos anti-CD3 para imitar la señal del receptor de células T (Chapoval y otros, 2001). Además, los estudios *in vivo* que usaron aloinjertos cardíacos en ratones B7-H3 -/- mostraron una disminución en la producción de transcritos claves de ARNm de citocinas, quimiocinas y receptores de quimiocinas (por ejemplo, IL-2, IFN- γ , proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y proteína inducible IFN (IP)-10) en comparación con el control de tipo salvaje (Wang y otros, 2005). Por el contrario, se ha observado la función coinhibidora de B7-H3, por ejemplo, en ratones donde la proteína B7-H3 inhibía la activación de las células T y la producción de citocinas efectoras (Suh y otros, 2003). Aunque no se han identificado ligandos para la B7-H3 humana, se ha descubierto que la B7-H3 murina se une al receptor desencadenante expresado en las células mieloides (TREM-) como el transcrito 2 (TLT-2), un modulador de las respuestas celulares de inmunidad adaptativa e innata. La unión de la B7-H3 murina a TLT-2 en células T CD8⁺ mejora las funciones efectoras de las células T tales como proliferación, citotoxicidad y producción de citocinas (Hashiguchi y otros, Proc. Nat'l. Acad. Sci. Estados Unidos 105(30): 10495-500 (2008)).

B7-H3 no se expresa constitutivamente en muchas células inmunes (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), células T y células presentadoras de antígenos (APC)), sin embargo, su expresión puede inducirse. Además, la expresión de B7-H3 no se limita a las células inmunitarias. Los transcritos de B7-H3 se expresan en una variedad de tejidos humanos que incluyen colon, corazón, hígado, placenta, próstata, intestino delgado, testículos y útero, así como también osteoblastos, fibroblastos, células epiteliales y otras células de linaje no linfóide, lo que podría indicar funciones inmunológicas y no inmunológicas (Nygren y otros, Front Biosci. 3:989-93 (2011)). Sin embargo, la expresión de proteínas en tejido normal se mantiene típicamente a un nivel bajo y, por lo tanto, puede estar sujeta a regulación postranscripcional.

B7-H3 también se expresa en una variedad de cánceres humanos, que incluyen cáncer de próstata, carcinoma de células renales de células claras, glioma, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, leucemia mieloide aguda (AML), linfoma no Hodgkin (NHL), cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer renal, carcinoma hepatocelular, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas hipofaríngeas, glioblastoma, neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de endometrio y carcinoma de células uroteliales. Aunque el papel de B7-H3 en las células cancerosas no está claro, su expresión puede orquestar eventos de señalización que pueden proteger a las células cancerosas de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Por ejemplo, B7-H3 se sobreexpresa en la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado y adenocarcinomas de próstata, y los niveles altos de expresión de B7-H3 en estas células cancerosas están asociados con un mayor riesgo de progresión del cáncer después de la cirugía (Roth y otros, Res. 67(16): 7893-900 (2007)). Además, la expresión de B7-H3 en el tumor en el NSCLC se correlacionó inversamente con el número de linfocitos que infiltran el tumor y se correlacionó significativamente con la metástasis en los ganglios linfáticos (Sun y otros, Lung Cancer 53(2): 143-51 (2006)). El nivel de B7-H3 soluble circulante en pacientes con NSCLC también se ha asociado con un estadio tumoral más alto, tamaño del tumor, metástasis en los ganglios linfáticos y metástasis a distancia (Yamato y otros, Br. J. Cancer 101(10): 1709-16 (2009)).

B7-H3 también puede desempeñar un papel importante en las respuestas antitumorales mediadas por células T de una manera dependiente del contexto. Por ejemplo, la expresión en células tumorales de cáncer gástrico de B7-H3 se correlacionó positivamente con el tiempo de supervivencia, la profundidad de infiltración y el tipo de tejido (Wu y otros, World J. Gastroenterol. 12(3): 457-9 (2006)). Además, la alta expresión de B7-H3 en células tumorales pancreáticas se asoció con la supervivencia del paciente después de la resección quirúrgica y se correlacionó significativamente con el número de células T CD8⁺ infiltrantes del tumor (Loos y otros, BMC Cancer 9:463 (2009)).

Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) representan una clase relativamente nueva de agentes terapéuticos que comprenden un anticuerpo conjugado con un fármaco citotóxico a través de un enlazador químico. El concepto

terapéutico de los ADC es combinar las capacidades de unión de un anticuerpo con un fármaco, donde el anticuerpo se usa para administrar el fármaco a una célula tumoral mediante la unión a un antígeno de superficie diana, incluidos los antígenos de superficie diana que se sobreexpresan en las células tumorales.

- 5 Sigue existiendo una necesidad en la técnica de anticuerpos anti-B7-H3 y ADC anti-B7-H3 que puedan usarse con fines terapéuticos en el tratamiento del cáncer.

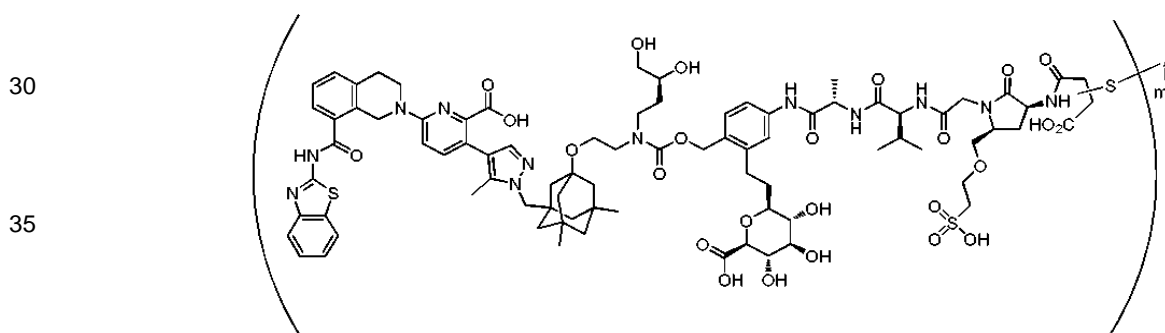
El documento US 2012/0294796 se refiere a los anticuerpos anti-B7-H3 y las composiciones farmacéuticas que los comprenden. El documento US 2012/0294796 señala que los anticuerpos anti-B7-H3 descritos en él pueden conjugarse o asociarse con una molécula radiactiva, toxina (calicheamicina), molécula quimioterapéutica, liposomas u otras vesículas que contienen composiciones quimioterapéuticas. Sin embargo, el documento US 2012/0294796 no describe la conjugación de los anticuerpos anti-B7-H3 con inhibidores de Bcl-xL.

15 Deryk Loo y otros "resumen 1201: conjugados de anticuerpo-fármaco anti-B7-H3 como agentes terapéuticos potenciales para el cáncer sólido" describen el ADC anti-B7-H3 auristatina E. Sin embargo, no describen la conjugación de anticuerpos anti-B7-H3 con inhibidores de Bcl-xL.

Resumen de la invención

20 La presente invención proporciona los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) que se unen específicamente a la B7-H3 humana. La presente invención proporciona ADC novedosos que pueden suministrar inhibidores de Bcl-xL selectivamente a células cancerosas diana, por ejemplo, células que expresan B7-H3.

25 La presente invención proporciona un Conjugado Anticuerpo-Fármaco anti-hB7-H3 (ADC) que comprende la siguiente estructura:



en donde m es 2 y Ab es un anticuerpo anti-hB7-H3, en donde el anticuerpo Ab comprende

un dominio CDR3 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35, un dominio CDR2 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34 y un dominio CDR1 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33; y

un dominio CDR3 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 39, un dominio CDR2 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 38 y un dominio CDR1 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 37.

En una modalidad, el Ab es un anticuerpo anti-hB7-H3, en donde el anticuerpo anti-hB7H3 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 147, y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 144. En una modalidad, el Ab es un anticuerpo anti-hB7-H3, en donde el anticuerpo anti-hB7-H3 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 168, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 169.

En una modalidad, el ADC es huAb13v1-AAA, en donde AAA es un sintón descrito en la Tabla B, y en donde el sintón conjugado está en forma abierta.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva del ADC descrito en la presente descripción y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar el cáncer, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un ADC descrito en la presente descripción a un sujeto que lo necesite.

- En una modalidad, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer de ovario, glioblastoma, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer gástrico, melanoma, carcinoma hepatocelular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, leucemia, por ejemplo, leucemia mieloide aguda (AML) y linfoma, por ejemplo, linfoma no Hodgkin (NHL).
- En una modalidad, el cáncer es un carcinoma de células escamosas. En una modalidad, el carcinoma de células escamosas es cáncer de pulmón escamoso o cáncer de cabeza y cuello escamoso.
- En una modalidad, el cáncer es cáncer de mama triple negativo.
- En una modalidad, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- En una modalidad, el cáncer se caracteriza por tener una mutación EGFR activadora. En una modalidad, la mutación activadora del EGFR se selecciona del grupo que consiste en una mutación por delección del exón 19, una mutación de sustitución de un solo punto L858R en el exón 21, una mutación de un punto T790M y sus combinaciones.
- En un aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir o disminuir el crecimiento de un tumor sólido en un sujeto que tiene un tumor sólido, dicho método que comprende administrar una cantidad efectiva de un ADC descrito en la presente descripción al sujeto que tiene el tumor sólido, de manera que el crecimiento del tumor sólido se inhibe o disminuye.
- En una modalidad, el tumor sólido es un carcinoma de pulmón de células no pequeñas.
- En una modalidad, el ADC se administra en combinación con un agente adicional o una terapia adicional.
- En una modalidad, el agente adicional se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD 1 (por ejemplo, pembrolizumab), un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab), un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab), un inhibidor de MEK (por ejemplo, trametinib), un inhibidor de ERK, un inhibidor de BRAF (por ejemplo, dabrafenib), osimertinib, erlotinib, gefitinib, sorafenib, un inhibidor de CDK9 (por ejemplo, dinaciclib), un inhibidor de MCL-1, temozolomida, un inhibidor de Bcl-2 (por ejemplo, venetoclax), un inhibidor de Bcl-xL, ibrutinib, un inhibidor de mTOR (por ejemplo, everolimus), un inhibidor de PI3K (por ejemplo buparlisib), duvelisib, idelalisib, un inhibidor de AKT, un inhibidor de HER2 (por ejemplo, lapatinib), un taxano (por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, nab-paclitaxel), un ADC que comprende una auristatina, un ADC que comprende un PBD (por ejemplo, rovalpituzumab tesirina), un ADC que comprende un maitansinoide (por ejemplo, TDM1), un agonista TRAIL, un inhibidor del proteasoma (por ejemplo, bortezomib) y un inhibidor de la nicotinamida fosforribosiltransfera (NAMPT).
- En una modalidad, el ADC anti-B7-H3 de la invención se administra en combinación con venetoclax a un sujeto humano para el tratamiento del cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC).
- En una modalidad, la terapia adicional es radiación.
- En una modalidad, el agente adicional es un agente quimioterapéutico.
- En un aspecto, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de un ADC según se reivindica, el proceso comprende:
- tratar un anticuerpo en una solución acuosa con una cantidad efectiva de un agente reductor de disulfuro a 30-40 °C durante al menos 15 minutos, y luego enfriar la solución del anticuerpo a 20-27 °C;
- añadir a la solución de anticuerpo reducido una solución de agua/dimetilsulfóxido que comprende sintón 2.166 (Tabla B); ajustar el pH de la solución a un pH de 7,5 a 8,5;
- dejar que la reacción se desarrolle durante 48 a 80 horas para formar el ADC;
- en donde la masa se desplaza en 18 ± 2 amu por cada hidrólisis de una succinimida a succinamida medida por espectrometría de masas por pulverización de electrones; y
- en donde el ADC se purifica opcionalmente mediante cromatografía de interacción hidrófoba.
- En otro aspecto, la presente invención proporciona un ADC preparado mediante el proceso descrito anteriormente.
- Breve descripción de los dibujos
- La Figura 1 es una representación gráfica de la agrupación de epítomos de anticuerpos del hibridoma anti-B7-H3 murino según se determina mediante ensayos de unión por pares.
- La Figura 2 representa una reducción de anticuerpos, una modificación con un derivado de maleimida para dar un intermedio de tiosuccinimida y la posterior hidrólisis del resto de tiosuccinimida.

La Figura 5 representa la caracterización por MS de la cadena ligera y la cadena pesada de huAb13v1 1) antes de la conjugación, 2) después de la conjugación con un derivado de maleimida para dar un intermediario de tiosuccinimida y 3) después de la hidrólisis del anillo de tiosuccinimida mediada por pH 8.

Descripción detallada de la invención

Los aspectos de la invención se refieren al ADC anti-B7-H3 y a las composiciones farmacéuticas del mismo. Los métodos de uso de los ADC descritos en la presente descripción para detectar la B7-H3 humana, para inhibir la actividad de la B7-H3 humana (*in vitro* o *in vivo*) y para tratar cánceres también están incluidos en la invención. En determinadas modalidades, la invención proporciona las composiciones de ADC anti-B7-H3 que comprenden los ADC, los métodos para preparar los ADC y varios métodos para usar los ADC.

Los expertos en la técnica también apreciarán que los diversos ADC y/o sintones de ADC descritos en la presente descripción pueden estar en forma de sales y, en determinadas modalidades, en particular, sales farmacéuticamente aceptables. Los compuestos de la presente descripción que poseen un grupo funcional suficientemente ácido, suficientemente básico o ambos, pueden reaccionar con cualquiera de varias bases inorgánicas y ácidos inorgánicos y orgánicos, para formar una sal. Alternativamente, los compuestos que están cargados de forma inherente, tales como los que tienen un nitrógeno cuaternario, pueden formar una sal con un contraión apropiado, por ejemplo, un haluro tal como un bromuro, cloruro o fluoruro.

Los ácidos comúnmente empleados para formar sales de adición de ácido son los ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido p-bromofenilsulfónico, ácido carbónico, ácido succínico, ácido cítrico, etc. Las sales de adición de bases incluyen las derivadas de bases inorgánicas, tales como hidróxidos, carbonatos, bicarbonatos de amonio y de metales alcalinos o alcalinotérreos, y similares.

En la descripción más abajo, si se incluyen tanto los diagramas estructurales como la nomenclatura y si la nomenclatura entra en conflicto con el diagrama estructural, el diagrama estructural se controla.

Más abajo se proporciona una Descripción Detallada de la Invención:

I. Definiciones

II. Anticuerpos Anti-B7-H3

II.A. Anticuerpos Anti-B7-H3 Quiméricos

II.B. Anticuerpos Anti-B7-H3 Humanizados

III. Conjugados Anticuerpo-Fármaco anti-B7-H3 (ADC)

III.A. ADC Inhibidores Anti-B7-H3/Bcl-xL

III.A.1. Inhibidores de Bcl-xL

III.A.2 Enlazadores de Bcl-xL

Enlazadores Escindibles

Enlazadores no Escindibles

Grupos Usados para Unir Enlazadores a Anticuerpos Anti-B7-H3

Consideraciones sobre la Selección del Enlazador

III.A.3. Sintones Bcl-xL ADC

III.A.4 Métodos de Síntesis de ADC Bcl-xL

III.A.5. Métodos Generales para Sintetizar Inhibidores de Bcl-xL

III.A.6. Métodos Generales para Sintetizar Sintones

III.A.7. Métodos Generales para Sintetizar ADC anti-B7-H3

III.B. ADC anti-B7-H3: Otros Fármacos Ilustrativos para la Conjugación

III.C. ADC anti-B7-H3: Otros Enlazadores Ilustrativos

IV. Purificación de ADC anti-B7-H3

V. Usos de Anticuerpos Anti-B7-H3 y ADC anti-B7-H3

VI. Composiciones Farmacéuticas

Definiciones

Para que la invención se entienda más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Además, debe tenerse en cuenta que siempre que se recita un valor o intervalo de valores de un parámetro, se pretende que los valores e

intervalos intermedios a los valores enumerados también formen parte de esta invención.

El término "anticuerpo anti-B7-H3" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a B7-H3. Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés, es decir, B7-H3, es uno capaz de unirse a ese antígeno con suficiente afinidad de manera que el anticuerpo sea útil para dirigirse a una célula que expresa el antígeno. En una modalidad preferida, el anticuerpo se une específicamente a la B7-H3 humana (hB7-H3). Ejemplos de anticuerpos anti-B7-H3 se describen en los ejemplos más abajo. A menos que se indique de cualquier otra manera, el término "anticuerpo anti-B7-H3" se refiere a un anticuerpo que se une a B7-H3 de tipo salvaje (por ejemplo, una isoforma 4IgB7-H3 de B7-H3) o cualquier variante de B7-H3. La secuencia de aminoácidos de la B7-H3 humana de tipo salvaje se proporciona más abajo como SEQ ID NO: 149, donde el péptido señal (residuos de aminoácidos 1-28) está subrayado.

```

MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPFPGFSLAQLNLIWQ
LTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVADEGSFTCFVSIIRDFGSAAVSL
QVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGGVPLTGNVTTTSMANEQGLFDV
HSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCFSFP
EPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVADEGSFTC
FVSIIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGGVPLTGNV
TTSQMANEQGLFDVHSLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTPFPEALWVTVGLSVC
LIALLVALAFVCRKIKQSCSEENAGAEDQDGESEKSKTALQPLKHSKEDDGQEI(A)(SEQ ID
NO:149

```

Por tanto, el ADC se une a la B7-H3 humana como se definió en SEQ ID NO: 149. El dominio extracelular (ECD) de la B7-H3 humana se proporciona en SEQ ID NO: 152 (inclusive de una marcada con His). Como tal, en una modalidad de la invención, el anticuerpo de ADC se une al ECD de la B7-H3 humana como se describió en el ECD de SEQ ID NO: 152.

Los términos "unión específica" o "que se une específicamente", como se usa en la presente descripción, en referencia a la interacción de un anticuerpo o un ADC con una segunda especie química, significan que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (por ejemplo, un determinante antigénico o epítipo) sobre la especie química; por ejemplo, un anticuerpo reconoce y se une a una estructura de proteína específica en lugar de a proteínas en general. Si un anticuerpo o ADC es específico para el epítipo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítipo A (o A libre, sin marcar), en una reacción que contiene "A" marcado y el anticuerpo, reducirá la cantidad de A marcado unido a el anticuerpo o ADC. A modo de ejemplo, un anticuerpo "se une específicamente" a una diana si el anticuerpo, cuando está marcado, puede competir fuera de su diana por el correspondiente anticuerpo no marcado. En una modalidad, un anticuerpo se une específicamente a una diana, por ejemplo, B7-H3, si el anticuerpo tiene una K_D para la diana de al menos aproximadamente 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M o menos (menos significa un número menor que 10^{-12} , por ejemplo, 10^{-13}). En una modalidad, el término "unión específica a B7-H3" o "se une específicamente a B7-H3", como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo o un ADC que se une a B7-H3 y tiene una constante de disociación (K_D) de $1,0 \times 10^{-7}$ M o menos, determinado por resonancia superficial de plasmones. Sin embargo, se entenderá que el anticuerpo o el ADC puede ser capaz de unirse específicamente a dos o más antígenos que están relacionados en secuencia. Por ejemplo, en una modalidad, un anticuerpo puede unirse específicamente a ortólogos de B7-H3 tanto humanos como no humanos (por ejemplo, ratón o primate no humano).

El término "anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que se une específicamente a un antígeno y comprende una o unas cadenas pesada (H) y ligera (L). Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada aquí como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada aquí como LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, ordenados desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Un anticuerpo puede ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY) y clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

Si bien el término "anticuerpo" no pretende incluir porciones de unión a antígeno de un anticuerpo (definido más abajo), se pretende, en determinadas modalidades, incluir un pequeño número de delecciones de aminoácidos del extremo carboxi de la o las cadenas pesadas. En una modalidad, un anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene delecciones de 1-5 aminoácidos en el extremo carboxi de la cadena pesada. En una modalidad, un anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que es una IgG, que tiene cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (cadenas L) que pueden unirse a hB7-H3. En una modalidad, un anticuerpo es un anticuerpo IgG monoclonal que comprende una cadena ligera lambda o kappa.

El término "porción de unión a antígeno" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente

"porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo"), como se usa en la presente descripción, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hB7-H3). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Tales modalidades de anticuerpos también pueden ser formatos

5 biespecíficos, de doble especificidad o multiespecíficos; unirse específicamente a dos o más antígenos diferentes. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un

10 fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de

15 los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y otros, (1989) Nature 341:544-546, Winter y otros, solicitud PCT WO 90/05144 A1 incorporado en la presente descripción como referencia), que comprende un único dominio variable; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, mediante el uso de métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite

20 fabricarse como una única cadena de proteína en la que VL y las regiones VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird y otros, (1988) Science 242:423-426; y Huston y otros, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos monocatenarios se incluyan dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. En determinadas modalidades de la invención, pueden incorporarse moléculas scFv en una proteína de fusión. También

25 se incluyen otras formas de anticuerpos monocatenarios, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero que usan un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P. y otros, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, RJ y otros, (1994) Structure 2:1121-1123). Tales porciones de unión a anticuerpos son conocidas en la técnica (Kontermann y Dubel eds., Antibody Engineering (2001) Springer-Verlag. Nueva York. 790 págs. (ISBN 3-540-41354-5).

Una IgG es una clase de anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras dispuestas en

30 forma de Y. Un dominio constante de IgG se refiere a un dominio constante de la cadena ligera o pesada. Se conocen en la técnica las secuencias ilustrativas de aminoácidos de dominio constante de cadena pesada y cadena ligera de la IgG humana y se representan más abajo en la Tabla A.

Tabla A: Secuencias de los dominios constantes de la cadena pesada de la IgG humana y los dominios constantes de la cadena ligera

| Proteína | Identificador de Secuencia | Secuencia |
|--|----------------------------|--|
| Región constante de Ig gamma-1 | SEQ ID NO:159 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK |
| Mutante de la región constante de Ig gamma-1 | SEQ ID NO:160 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK |
| Región constante de Ig Kappa | SEQ ID NO:161 | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC |
| Región constante de Ig Lambda | SEQ ID NO:162 | QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNK YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVE KTVAPTECS |

Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a B7-H3 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a otros antígenos además de B7-H3). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a B7-H3 puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como las moléculas de B7-H3 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a los anticuerpos que comprenden las secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y ligera de una especie no humana (por ejemplo, un ratón) pero en los que al menos una parte de la secuencia VH y/o VL se ha alterado para ser más "similar al humano", es decir, más similar a las secuencias variables de la línea germinal humana. En particular, el término "anticuerpo humanizado" es un anticuerpo o una variante, derivado, análogo o fragmento del mismo que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de interés y que comprende una región marco (FR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo humano y una región determinante de complementariedad (CDR) que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo no humano. Como se usa en la presente descripción, el término "sustancialmente" en el contexto de una CDR se refiere a una CDR que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 80 %, preferentemente al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una CDR de anticuerpo no humano. Un anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables (Fab, Fab', F(ab')₂, FabC, Fv) en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (es decir, anticuerpo donante) y todas o sustancialmente todas las regiones marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferentemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado contiene tanto la cadena ligera como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. En algunas modalidades, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena ligera humanizada. En otras modalidades, un anticuerpo humanizado solo contiene una cadena pesada humanizada. En

modalidades específicas, un anticuerpo humanizado solo contiene un dominio variable humanizado de una cadena ligera y/o cadena pesada humanizada.

El anticuerpo humanizado puede seleccionarse de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluidas IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluidas, sin limitación, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de una clase o isotipo, y pueden seleccionarse dominios constantes particulares para optimizar las funciones efectoras deseadas mediante el uso de las técnicas bien conocidas en la técnica.

Los términos "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "marcado de Kabat" se usan indistintamente en la presente descripción. Estos términos, que se reconocen en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de los residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en las regiones variables de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo (Kabat y otros, (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 y Kabat, EA y otros, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Solicitud NIH Núm. 91-3242). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable varía desde las posiciones de aminoácidos 31 a 35 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 65 para CDR2 y las posiciones de aminoácidos 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de la cadena ligera, la región hipervariable varía desde las posiciones de aminoácidos 24 a 34 para CDR1, las posiciones de aminoácidos 50 a 56 para CDR2 y las posiciones de aminoácidos 89 a 97 para CDR3.

Como se usa en la presente descripción, el término "CDR" se refiere a la región determinante de complementariedad dentro de las secuencias variables de los anticuerpos. Hay tres CDR en cada una de las regiones variables de la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LC), que se denominan CDR1, CDR2 y CDR3 (o específicamente HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, y LC CDR3), para cada una de las regiones variables. El término "conjunto de CDR" como se usa en la presente descripción se refiere a un grupo de tres CDR que se encuentran en una única región variable capaz de unirse al antígeno. Los límites exactos de estas CDR se han definido de manera diferente de acuerdo con los diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) y (1991)) no solo proporciona un sistema de numeración de residuos inequívoco aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de residuos precisos que definen las tres CDR. Estas CDR pueden denominarse CDR de Kabat. Chothia y colaboradores (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y Chothia y otros, Nature 342:877-883 (1989)) encontraron que determinadas subporciones dentro de las CDR de Kabat adoptan conformaciones de la cadena principal peptídica casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad a nivel de secuencia de aminoácidos. Estas subporciones se designaron como L1, L2 y L3 o H1, H2 y H3 donde la "L" y la "H" designan las regiones de cadena ligera y cadenas pesadas, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse CDR de Chothia, que tienen límites que se superponen con las CDR de Kabat. Padlan ha descrito otros límites que definen las CDR que se superponen con las CDR de Kabat (FASEB J. 9:133-139 (1995)) y MacCallum (J. Mol. Biol. 262(5):732-45 (1996)). Aún otras definiciones de límites de CDR pueden no seguir estrictamente uno de los sistemas anteriores, pero no obstante se superpondrán con las CDR de Kabat, aunque pueden acortarse o alargarse a la luz de predicciones o hallazgos experimentales de que determinados residuos o grupos de residuos o incluso CDR enteros no impacta significativamente en la unión del antígeno. Los métodos usados en la presente descripción pueden utilizar CDR definidas de acuerdo con cualquiera de estos sistemas, aunque las modalidades preferidas usan las CDR definidas por Kabat o Chothia.

Como se usa en la presente descripción, el término "marco" o "secuencia marco" se refiere a las secuencias restantes de una región variable menos las CDR. Debido a que la definición exacta de una secuencia CDR puede determinarse mediante diferentes sistemas, el significado de una secuencia marco está sujeto a interpretaciones correspondientemente diferentes. Las seis CDR (CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 de cadena ligera y CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 de cadena pesada) también dividen las regiones marco de la cadena ligera y la cadena pesada en cuatro subregiones (FR1, FR2, FR3 y FR4) en cada cadena, en las que CDR1 se coloca entre FR1 y FR2, CDR2 entre FR2 y FR3, y CDR3 entre FR3 y FR4. Sin especificar las subregiones particulares como FR1, FR2, FR3 o FR4, una región marco, como se hace referencia por otros, representa las FR combinadas dentro de la región variable de una única cadena de inmunoglobulina natural. Como se usa en la presente descripción, una FR representa una de las cuatro subregiones, y las FR representan dos o más de las cuatro subregiones que constituyen una región marco.

No es necesario que las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado correspondan con precisión a las secuencias parentales, por ejemplo, la CDR del anticuerpo donante o el marco consenso pueden mutagenizarse mediante sustitución, inserción y/o delección de al menos un residuo de aminoácido de manera que la CDR o el resto del marco en ese sitio no corresponde ni al anticuerpo donante ni al marco consenso. En una modalidad preferida, tales mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Normalmente, al menos el 80 %, preferentemente al menos el 85 %, con mayor preferencia al menos el 90 % y con la máxima preferencia al menos el 95 % de los residuos de anticuerpos humanizados corresponderán a los de las secuencias de FR y CDR parentales. Como se usa en la presente descripción, el término "marco consenso" se refiere a la región del marco en la secuencia de inmunoglobulina consenso. Como se usa en la presente descripción, el término "secuencia consenso de inmunoglobulina" se refiere a la secuencia formada a partir de los aminoácidos (o nucleótidos) que ocurren con más frecuencia en una familia de secuencias de inmunoglobulinas relacionadas (véase, por ejemplo, Winnaker, From

Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania 1987). En una familia de inmunoglobulinas, cada posición en la secuencia consenso está ocupada por el aminoácido que se encuentra con mayor frecuencia en esa posición en la familia. Si dos aminoácidos aparecen con la misma frecuencia, cualquiera de ellos puede incluirse en la secuencia consenso.

El término "marco aceptor humano", como se usa en la presente descripción, se refiere a un marco de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que comprende la secuencia de aminoácidos de un marco VH o VL derivado de un anticuerpo humano o fragmento de anticuerpo del mismo o un marco consenso humano de la secuencia en el que se pueden incorporar las CDR de una especie no humana.

El "por ciento (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia de péptido o polipéptido se define como el por ciento de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de péptido o polipéptido específico, después de alinear las secuencias e introduciendo huecos, si es necesario, para lograr el por ciento máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el propósito de determinar el por ciento de identidad de la secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un software de computadora disponible públicamente tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluidos los algoritmos necesarios para lograr el máximo alineamiento en toda la longitud de las secuencias que se comparan.

El término "anticuerpo multivalente" se usa en la presente descripción para indicar un anticuerpo que comprende dos o más sitios de unión al antígeno. En determinadas modalidades, el anticuerpo multivalente puede diseñarse para que tenga los tres o más sitios de unión al antígeno, y generalmente no es un anticuerpo de origen natural.

El término "anticuerpo multiespecífico" se refiere a un anticuerpo capaz de unirse a dos o más antígenos no relacionados. En una modalidad, el anticuerpo multiespecífico es un anticuerpo biespecífico que es capaz de unirse a dos antígenos no relacionados, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico, o una parte del mismo que se une al antígeno, que se une a B7-H3 y CD3.

El término "actividad" incluye las actividades tales como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo o ADC por un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-hB7-H3 que se une a un antígeno hB7-H3 y/o la potencia neutralizante de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-hB7-H3 cuya unión a hB7-H3 inhibe la actividad biológica de hB7-H3, por ejemplo, la inhibición de la proliferación de las líneas celulares que expresan B7-H3, por ejemplo, células H146 de carcinoma de pulmón humano, células H1650 de carcinoma pulmón humano o células EBC1 de carcinoma de pulmón humano.

El término "ensayo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)", como se usa en la presente descripción, se refiere a un ensayo *in vivo* usado para determinar si un anticuerpo anti-B7-H3 o ADC puede inhibir el crecimiento tumoral (por ejemplo, crecimiento adicional) y/o disminuir el crecimiento tumoral resultante del trasplante de células NSCLC en un ratón inmunodeficiente. Un ensayo de xenoinjerto de NSCLC incluye el trasplante de células de NSCLC en un ratón inmunodeficiente de manera que un tumor crece hasta un tamaño deseado, por ejemplo, 200-250 mm³, después de lo cual se administra el anticuerpo o ADC al ratón para determinar si el anticuerpo o ADC puede inhibir y/o disminuir el crecimiento tumoral. En determinadas modalidades, la actividad del anticuerpo o ADC se determina de acuerdo con el por ciento de inhibición del crecimiento tumoral (% TGI) con respecto a un anticuerpo control, por ejemplo, un anticuerpo IgG humano (o colección del mismo) que no se une específicamente a las células tumorales, por ejemplo, que se dirige a un antígeno no asociado con el cáncer o se obtiene de una fuente que no es cancerosa (por ejemplo, suero humano normal). En tales modalidades, el anticuerpo (o ADC) y el anticuerpo control se administran al ratón a la misma dosis, con la misma frecuencia y mediante la misma vía. En una modalidad, el ratón usado en el ensayo de xenoinjerto de NSCLC es un ratón con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y/o un ratón desnudo CD-1 atímico. Los ejemplos de células de NSCLC que pueden usarse en el ensayo de xenoinjerto de NSCLC incluyen, pero no se limitan a, células H1299 (NCI-H1299 [H-1299] (ATCC® CRL-5803)), células H1975 (células NCI-H1975 [H1975] (ATCC® CRL-5908™)) y células EBC-1.

El término "ensayo de xenoinjerto de carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC)", como se usa en la presente descripción, se refiere a un ensayo *in vivo* usado para determinar si un anticuerpo anti-B7-H3 o ADC, puede inhibir el crecimiento tumoral (por ejemplo, crecimiento adicional) y/o disminuir el crecimiento tumoral resultante del trasplante de células SCLC en un ratón inmunodeficiente. Un ensayo de xenoinjerto de SCLC incluye el trasplante de células de SCLC en un ratón inmunodeficiente de manera que un tumor crece hasta un tamaño deseado, por ejemplo, 200-250 mm³, después de lo cual se administra el anticuerpo o ADC al ratón para determinar si el anticuerpo o ADC puede inhibir y/o disminuir el crecimiento tumoral. En determinadas modalidades, la actividad del anticuerpo o ADC se determina de acuerdo con el por ciento de inhibición del crecimiento tumoral (% TGI) con respecto a un anticuerpo control, por ejemplo, un anticuerpo IgG humano (o colección del mismo) que no se une específicamente a las células tumorales, por ejemplo, que se dirige a un antígeno no asociado con el cáncer o se obtiene de una fuente que no es cancerosa (por ejemplo, suero humano normal). En tales modalidades, el anticuerpo (o ADC) y el anticuerpo control se administran al ratón a la misma dosis, con la misma frecuencia y

mediante la misma vía. En una modalidad, el ratón usado en el ensayo de xenoinjerto de NSCLC es un ratón con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y/o un ratón desnudo CD-1 atímico. Los ejemplos de células de SCLC que pueden usarse en el ensayo de xenoinjerto de SCLC incluyen, pero no se limitan a, células H146 (células NCI-H146 [H146] (ATCC® HTB-173™)) y células H847 (NCI-H847 [H847] (ATCC® CRL-5846™)). El término "epítipo" se refiere a una región de un antígeno que está unido por un anticuerpo o ADC. En determinadas modalidades, los determinantes de los epítipos incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en determinadas modalidades, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. En determinadas modalidades, se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su antígeno diana en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas.

El término "resonancia superficial de plasmones", como se usa en la presente descripción, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de las interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo, mediante el uso del sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, Nueva Jersey). Para más descripciones, véase Jonsson, U. y otros, (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jonsson, U. y otros, (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B. y otros, (1995) *J. Mol. Reconocer.* 8:125-131; y Johnsson, B. y otros, (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277. En una modalidad, la resonancia superficial de plasmones se determina de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 2.

El término " k_{on} " o " k_a ", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a la constante de velocidad en la asociación de un anticuerpo al antígeno para formar el complejo anticuerpo/antígeno.

El término " k_{off} " o " k_d ", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a la constante de velocidad de disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

El término " K_D ", como se usa en la presente descripción, pretende referirse a la constante de disociación en equilibrio de una interacción anticuerpo-antígeno particular (por ejemplo, anticuerpo huAb13 y B7-H3). La K_D se calcula mediante k_a/k_d .

El término "unión competitiva", como se usa en la presente descripción, se refiere a una situación en la que un primer anticuerpo compite con un segundo anticuerpo, por un sitio de unión en una tercera molécula, por ejemplo, un antígeno. En una modalidad, la unión competitiva entre dos anticuerpos se determina mediante el uso de análisis FACS.

El término "ensayo de unión competitiva" es un ensayo usado para determinar si dos o más anticuerpos se unen al mismo epítipo. En una modalidad, un ensayo de unión competitiva es un ensayo competitivo de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) que se usa para determinar si dos o más anticuerpos se unen al mismo epítipo determinando si la señal fluorescente de un anticuerpo marcado se reduce debido a la introducción de un anticuerpo no marcado, donde la competencia por el mismo epítipo reducirá el nivel de fluorescencia.

El término "anticuerpo marcado" como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, con un marcador incorporado que proporciona la identificación de la proteína de unión, por ejemplo, un anticuerpo. Preferentemente, el marcador es un marcador detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido con restos biotínico que pueden detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse por vía óptica o métodos colorimétricos). Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, 3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{177}Lu , ^{166}Ho , o ^{153}Sm); marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, luciferasa, fosfatasa alcalina); marcadores quimioluminiscentes; grupos biotínico; epítipos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítipo); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

El término "conjugado de anticuerpo-fármaco" o "ADC" se refiere a una proteína de unión, como un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, químicamente unido a uno o más fármacos químicos (también denominados en la presente descripción agentes, ojivas, y cargas útiles) que pueden ser opcionalmente agentes terapéuticos o citotóxicos. En la presente invención, un ADC incluye un anticuerpo, un fármaco (por ejemplo, un fármaco citotóxico) y un enlazador que permite la unión o conjugación del fármaco al anticuerpo. El ADC de la invención tiene 2 fármacos conjugados con el anticuerpo. En la presente invención, el fármaco es un inhibidor de Bcl-xL.

Los términos "conjugado anticuerpo-fármaco anti-B7-H3" o "ADC anti-B7-H3", usados indistintamente en la presente descripción, se refieren a un ADC que comprende un anticuerpo que se une específicamente a B7-H3, por lo que el anticuerpo se conjuga a uno o más agentes químicos). En una modalidad, el ADC anti-B7-H3 comprende el

anticuerpo huAb13v1 conjugado con un inhibidor de Bcl-xL. En la presente invención, el ADC anti-B7-H3 se une a la B7-H3 humana (hB7-H3).

El término "inhibidor de Bcl-xL", como se usa en la presente descripción, se refiere a un compuesto que antagoniza la actividad de Bcl-xL en una célula. En una modalidad, un inhibidor de Bcl-xL promueve la apoptosis de una célula mediante la inhibición de la actividad de Bcl-xL.

El término "relación de fármaco a anticuerpo" o "DAR" se refiere al número de fármacos, por ejemplo, inhibidor de Bcl-xL, unidos al anticuerpo del ADC. El número de fármacos, por ejemplo, inhibidores de Bcl-xL, unidos al anticuerpo del ADC de la presente invención es 2.

El término "ensayo de xenoinjerto", como se usa en la presente descripción, se refiere a un ensayo de xenoinjerto de tumor humano, en donde se trasplantan células tumorales humanas, ya sea debajo de la piel o en el tipo de órgano en el que se originó el tumor, en ratones inmunodeprimidos que no rechazan células humanas.

El término "cáncer" se refiere a o describe la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen glioblastoma, leucemia mieloide aguda (AML), linfoma no Hodgkin (NHL), cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama triple negativo), cáncer de páncreas, tumores de células escamosas, carcinoma de células escamosas (por ejemplo, cáncer de pulmón de células escamosas o cáncer de cabeza y cuello de células escamosas), cáncer anal, cáncer de piel y cáncer de vulva. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene un tumor o tumores que sobreexpresan B7-H3. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene un tumor sólido que probablemente sobreexpresen B7-H3. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene cáncer de pulmón de células no pequeñas de células escamosas (NSCLC). En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene tumores sólidos, incluidos tumores sólidos avanzados. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene cáncer de próstata. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene cáncer de pulmón de células no pequeñas. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene glioblastoma. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene cáncer de colon. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene cáncer de cabeza y cuello. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene cáncer de riñón. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene carcinoma de células renales de células claras. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene glioma. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene melanoma. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene cáncer de páncreas. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene cáncer gástrico. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene cáncer de ovario. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene cáncer colorrectal. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene cáncer renal. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene cáncer de pulmón de células pequeñas. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene carcinoma hepatocelular. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene carcinoma de células escamosas hipofaríngeas. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene neuroblastoma. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene cáncer de mama. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene cáncer de endometrio. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene carcinoma de células uroteliales. En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene leucemia mieloide aguda (AML). En una modalidad, los ADC de la invención se administran a un paciente que tiene linfoma no Hodgkin (NHL).

El término "tumor que expresa B7-H3", como se usa en la presente descripción, se refiere a un tumor que expresa la proteína B7-H3. En una modalidad, la expresión de B7-H3 en un tumor se determina mediante el uso de tinción inmunohistoquímica de las membranas de las células tumorales, donde cualquier tinción inmunohistoquímica por encima del nivel de fondo en una muestra de tumor indica que el tumor es un tumor que expresa B7-H3. Los métodos para detectar la expresión de B7-H3 en un tumor son conocidos en la técnica e incluyen los ensayos inmunohistoquímicos. Por el contrario, un "tumor negativo para B7-H3" se define como un tumor que tiene una ausencia de tinción de la membrana para B7-H3 por encima del fondo en una muestra de tumor según se determina mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Los términos "que sobreexpresa", "sobreexpresión" o "sobreexpresado" se refieren indistintamente a un gen que se transcribe o traduce a un nivel detectablemente mayor, normalmente en una célula cancerosa, en comparación con una célula normal. Por lo tanto, la sobreexpresión se refiere tanto a la sobreexpresión de proteína y ARN (debido a un aumento de la transcripción, procesamiento postranscripcional, traducción, procesamiento postraduccional, estabilidad alterada y degradación de la proteína alterada), así como también a la sobreexpresión local debido a patrones de tráfico de proteínas alterados (localización nuclear aumentada) y actividad funcional aumentada, por

ejemplo, como en una hidrólisis enzimática aumentada del sustrato. Por tanto, la sobreexpresión se refiere a los niveles de proteína o de ARN. La sobreexpresión también puede ser del 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más en comparación con una célula normal o una célula de comparación. En determinadas modalidades, los ADC anti-B7-H3 de la invención se usan para tratar tumores sólidos que probablemente sobreexpresen B7-H3.

El término "amplificación de genes", como se usa en la presente descripción, se refiere a un proceso celular caracterizado por la producción de múltiples copias de cualquier fragmento particular de ADN. Por ejemplo, una célula tumoral puede amplificar o copiar segmentos cromosómicos como resultado de señales celulares y, a veces, eventos ambientales. El proceso de amplificación de genes conduce a la producción de copias adicionales del gen. En una modalidad, el gen es B7-H3, es decir, "amplificación de B7-H3". En una modalidad, las composiciones y los métodos descritos en la presente descripción se usan para tratar a un sujeto que tiene cáncer amplificado con B7-H3.

El término "administración", como se usa en la presente descripción, se refiere al suministro de una sustancia (por ejemplo, un anticuerpo anti-B7-H3 o ADC) para lograr un objetivo terapéutico (por ejemplo, el tratamiento de un trastorno asociado a B7-H3). Los modos de administración pueden ser parenteral, enteral y tópico. La administración parenteral suele ser por inyección e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

El término "terapia de combinación" o "combinación" en el contexto de un método terapéutico (por ejemplo, un método de tratamiento), como se usa en la presente descripción, se refiere a la administración de dos o más sustancias terapéuticas, por ejemplo, un ADC y un agente terapéutico adicional. El agente terapéutico adicional puede administrarse concomitantemente con, antes o después de la administración del ADC anti-B7-H3.

Como se usa en la presente descripción, el término "cantidad efectiva" o "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de un fármaco, por ejemplo, un anticuerpo o ADC, que es suficiente para reducir o mejorar la gravedad y/o duración de un trastorno, por ejemplo, cáncer, o uno o más síntomas del mismo, previenen el avance de un trastorno, provocan la regresión de un trastorno, previenen la recurrencia, desarrollo, aparición o progresión de uno o más síntomas asociados con un trastorno, detectan un trastorno o potencian o mejoran los efectos profiláctico o terapéutico de otra terapia (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico). La cantidad efectiva de un ADC puede, por ejemplo, inhibir el crecimiento del tumor (por ejemplo, inhibir un aumento en el volumen del tumor), disminuir el crecimiento del tumor (por ejemplo, disminuir el volumen del tumor), reducir el número de células cancerosas y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. La cantidad efectiva puede, por ejemplo, mejorar la supervivencia libre de enfermedad (DFS), mejorar la supervivencia general (OS) o disminuir la probabilidad de recurrencia.

Como se usa en la presente descripción, el término "estable" se refiere a los compuestos que poseen estabilidad suficiente para permitir la fabricación y que mantienen la integridad del compuesto durante un período de tiempo suficiente para ser útil para el propósito detallado en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

El término sal cuando se usa en el contexto de "o una sal del mismo" incluye sales comúnmente usadas para formar sales de metales alcalinos y para formar sales de adición de ácidos libres o bases libres. En general, estas sales pueden prepararse típicamente por medios convencionales haciendo reaccionar, por ejemplo, el ácido o la base apropiados con un compuesto de la invención.

Cuando se pretende administrar una sal a un paciente (en contraposición, por ejemplo, a que se utilice en un contexto *in vitro*), la sal es preferentemente farmacéuticamente aceptable y/o fisiológicamente compatible. El término "farmacéuticamente aceptable" se usa como adjetivo en esta solicitud de patente para significar que el nombre modificado es apropiado para su uso como producto farmacéutico o como parte de un producto farmacéutico. El término "sal farmacéuticamente aceptable" incluye sales comúnmente usadas para formar sales de metales alcalinos y para formar sales de adición de ácidos libres o bases libres. En general, estas sales pueden prepararse típicamente por medios convencionales haciendo reaccionar, por ejemplo, el ácido o la base apropiados con un compuesto de la invención.

I. Anticuerpos Anti-B7-H3

Los anticuerpos anti-B7-H3 descritos en la presente descripción proporcionan a los ADC de la invención la capacidad de unirse a B7-H3 de manera que el fármaco citotóxico Bcl-xL unido al anticuerpo pueda administrarse a la célula que expresa B7-H3, particularmente a una célula de cáncer que expresa B7-H3.

Si bien el término "anticuerpo" se usa en todas partes, debe tenerse en cuenta que los fragmentos de anticuerpos (es decir, las porciones de unión al antígeno de un anticuerpo anti-B7-H3) también se incluyen en la invención y pueden incluirse en las modalidades (métodos y composiciones) descrito a lo largo. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo anti-B7-H3 puede conjugarse con los inhibidores de Bcl-xL descritos en la presente descripción. Por

tanto, está dentro del alcance de la invención que, en determinadas modalidades, los fragmentos de anticuerpos de los anticuerpos anti-B7-H3 descritos en la presente descripción se conjugan con inhibidores de Bcl-xL mediante enlazadores. En determinadas modalidades, la porción de unión del anticuerpo anti-B7-H3 es un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv unido por disulfuro, un scFv, un anticuerpo de dominio único o un diacuerpo.

II.A. Anticuerpos Anti-B7-H3 Quiméricos

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes especies de animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi y otros, BioTechniques 4:214 (1986); Gillies y otros, (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; Patente de EE. UU. Núm. 5,807,715; 4,816,567; y 4,816,397. Además, se desarrollaron técnicas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison y otros, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger y otros, 1984, Nature 312:604-608; Takeda y otros, 1985, Nature 314:452-454) mediante el corte y empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada.

Como se describe en el Ejemplo 3, se identificaron dieciocho anticuerpos murinos anti-B7-H3 que tenían una alta actividad de unión específica contra B7-H3 humano y de Cynomolgus. Se generaron anticuerpos quiméricos, en el contexto de una región constante de inmunoglobulina humana, a partir de estos dieciocho anticuerpos.

II.B. Anticuerpos Anti-B7-H3 Humanizados

Los anticuerpos quiméricos descritos en la presente descripción pueden usarse en la producción de anticuerpos anti-B7-H3 humanizados. Por ejemplo, tras la generación y caracterización de los anticuerpos quiméricos anti-B7-H3 chAb1-chAb18, se seleccionaron los anticuerpos chAb3, chAb13 y chAb18 para humanización. Específicamente, se crearon seis anticuerpos humanizados diferentes basados en chAb3, nueve anticuerpos humanizados diferentes basados en chAb13 (referidos en la presente descripción como huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8, huAb13v9), y se crearon diez anticuerpos humanizados diferentes basados en chAb18. Las Tablas 18 y 19 proporcionan las secuencias de aminoácidos de las regiones CDR, VH y VL de chAb13 humanizado.

Generalmente, los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de un anticuerpo de especie no humana que se une al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Se describen las secuencias de Ig humanas conocidas, por ejemplo, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/~about.pedro/research_tools.html; www.mgen.uniheidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH-05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/about.hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/about.yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/about.fccl/protocol.html; www.isacnet.org/sites_geo.html; aximtl.imt.unimarburg.de/about.rek/AEPStart.html; baserv.uci.kun.nl/about.jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/about.honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/about.mrc7/h-umanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/about.fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr_roducts.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. Kabat y otros, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud de EE. UU. (1983). Tales secuencias importadas pueden usarse para reducir la inmunogenicidad o reducir, potenciar o modificar la unión, afinidad, asociación, disociación, avidéz, especificidad, semivida o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica.

Los residuos del marco en las regiones marco humanas pueden sustituirse con el residuo correspondiente del anticuerpo donante de la CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones de marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, modelando las interacciones de la CDR y los residuos marco para identificar residuos marco importantes para la unión de antígenos y comparación de secuencias para identificar residuos marco inusuales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, Queen y otros, Patente de Estados Unidos Núm. 5,585,089; Riechmann y otros, Nature 332:323 (1988)) Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Hay programas informáticos disponibles que ilustran y muestran probables estructuras conformacionales

tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias consenso e importarse de manera que se logre la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad por el o los antígenos diana. En general, los residuos de la CDR están directa y sustancialmente implicados en influir en la unión del antígeno. Los anticuerpos pueden humanizarse mediante el uso de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tales como, pero que no se limitan a, las descritas en Jones y otros, *Nature* 321:522 (1986); Verhoeyen y otros, *Science* 239:1534 (1988)), Sims y otros, *J. Immunol.* 151:2296 (1993); Chothia y Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987), Caster y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992); Presta y otros, *J. Immunol.* 151:2623 (1993), Padlan, *Molecular Immunology* 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka y otros, *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska. y otros, *PNAS* 91:969-973 (1994); Solicitud PCT WO 91/09967, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, EP 592,106; EP 519,596, EP 239,400, Patentes de los EE.UU. Núm. 5,565,332, 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5,814,476, 5,763,192, 5,723,323, 5,766,886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4,816,567.

Anticuerpos anti-B7-H3 humanizados derivados de chab13

Los nueve anticuerpos humanizados diferentes creados a partir de chAb13 incluyen los siguientes:

A) huAb13v1 (secuencia de aminoácidos de la VH indicada en SEQ ID NO: 147 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH establecidas en SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente; y secuencia de aminoácidos de la VL indicada en SEQ ID NO: 144 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL establecidas en SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente);

B) huAb13v2 (secuencia de aminoácidos de la VH establecida en SEQ ID NO: 146 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH establecidas en SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente; y secuencia de aminoácidos de la VL establecida en SEQ ID NO: 143 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL establecidas en SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente);

C) huAb13v3 (secuencia de aminoácidos de la VH establecida en SEQ ID NO: 146 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH establecidas en SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente; y secuencia de aminoácidos de la VL establecida en SEQ ID NO: 144 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL establecidas en SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente);

D) huAb13v4 (secuencia de aminoácidos de la VH establecida en SEQ ID NO: 146 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH establecidas en SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente; y secuencia de aminoácidos de la VL establecida en SEQ ID NO: 145 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL establecidas en SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente);

E) huAb13v5 (secuencia de aminoácidos de la VH establecida en SEQ ID NO: 147 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH establecidas en SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente; y secuencia de aminoácidos de la VL establecida en SEQ ID NO: 143 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL establecidas en SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente);

F) huAb13v6 (secuencia de aminoácidos de la VH establecida en SEQ ID NO: 147 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH establecidas en SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente; y secuencia de aminoácidos de la VL establecida en SEQ ID NO: 145 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL establecidas en SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente);

G) huAb13v7 (secuencia de aminoácidos de la VH establecida en SEQ ID NO: 148 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH establecidas en SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente; y secuencia de aminoácidos de la VL establecida en SEQ ID NO: 143 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL establecidas en SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente);

H) huAb13v8 (secuencia de aminoácidos de la VH establecida en SEQ ID NO: 148 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH establecidas en SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente; y secuencia de aminoácidos de la VL establecida en SEQ ID NO: 144 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL establecidas en SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente);

I) huAb13v9 (secuencia de aminoácidos de la VH establecida en SEQ ID NO: 148 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VH establecidas en SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente; y secuencia de aminoácidos de la VL establecida en SEQ ID NO: 145 y secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de la VL establecidas en SEQ ID NO: 37, 38 y 39, respectivamente).

Por tanto, un aspecto de la presente descripción proporciona anticuerpos que comprenden secuencias variables y/o CDR de un anticuerpo humanizado derivado de chAb13. La presente descripción presenta anticuerpos anti-B7-H3 que se derivan de chAb13 y tienen características mejoradas, por ejemplo, afinidad de unión mejorada a la proteína B7-H3 aislada y unión mejorada a células que expresan B7-H3, como se describió en los Ejemplos más abajo. En conjunto, estos nuevos anticuerpos se denominan en la presente descripción "anticuerpos variantes de Ab13". Generalmente, los anticuerpos variantes de Ab13 retienen la misma especificidad de epítipo que Ab13.

También pueden realizarse sustituciones conservadoras de aminoácidos en porciones de los anticuerpos distintas

de, o además de, las CDR. Por ejemplo, pueden realizarse modificaciones conservadoras de aminoácidos en una región marco o en la región Fc. Una región variable o una cadena pesada o ligera puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-10, 1-15, 1-20, 1-25, o 1-50 sustituciones de aminoácidos conservadoras con relación a las secuencias de anticuerpos anti-B7-H3 proporcionadas en la presente descripción. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-B7-H3 comprende una combinación de modificación de aminoácidos conservadora y no conservadora.

Generar y seleccionar CDR que tengan actividad de unión y/o neutralización de B7-H3 preferida con respecto a hB7-H3, métodos estándar conocidos en la técnica para generar anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos y evaluar la unión de B7-H3 y/o las características neutralizantes de esos anticuerpos, o porciones de unión a antígeno de los mismos, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos específicamente en la presente descripción.

En determinadas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-B7-H3, o su porción de unión a antígeno, comprende un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina seleccionado del grupo que consiste en un dominio constante de IgG humana, un dominio constante de IgM humana, un dominio constante de IgE humana y un dominio constante de IgA humana. En modalidades adicionales, el anticuerpo, o su porción de unión a antígeno, tiene una región constante de la cadena pesada de IgG1, una región constante de la cadena pesada de IgG2, una región constante de IgG3 o una región constante de la cadena pesada de IgG4. Preferentemente, la región constante de la cadena pesada es una región constante de la cadena pesada de IgG1 o una región constante de la cadena pesada de IgG4. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de la cadena ligera, una región constante de la cadena ligera kappa o una región constante de la cadena ligera lambda. Preferentemente, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena ligera kappa. Alternativamente, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de cadena sencilla.

En determinadas modalidades, la porción de unión del anticuerpo anti-B7-H3 es un Fab, un Fab', un F(ab')₂, un Fv, un Fv unido por disulfuro, un scFv, un anticuerpo de dominio único o un diacuerpo.

En determinadas modalidades, el anticuerpo anti-B7-H3, o su porción de unión a antígeno, es un anticuerpo multiespecífico, por ejemplo, un anticuerpo biespecífico.

Se han descrito reemplazos de residuos de aminoácidos en la porción Fc para alterar la función efectora del anticuerpo (Winter y otros, Patentes de EE. UU. Núm. 5,648,260 y 5,624,821). La porción Fc de un anticuerpo media varias funciones efectoras importantes, por ejemplo, inducción de citocinas, ADCC, fagocitosis, citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y tasa de vida media/aclaramiento de anticuerpos y complejos antígeno-anticuerpo. En algunos casos, estas funciones efectoras son deseables para el anticuerpo terapéutico, pero en otros casos pueden ser innecesarias o incluso perjudiciales, en dependencia de los objetivos terapéuticos. Ciertos isotipos de IgG humana, en particular IgG1 e IgG3, median ADCC y CDC mediante la unión al FCγRs y al complemento C1q, respectivamente. Los receptores Fc neonatales (FcRn) son los componentes críticos que determinan la vida media circulante de los anticuerpos. En otra modalidad más, al menos un residuo de aminoácido se reemplaza en la región constante del anticuerpo, por ejemplo, la región Fc del anticuerpo, de manera que se alteran las funciones efectoras del anticuerpo.

Una modalidad de la invención incluye un anticuerpo anti-B7-H3 marcado, o una porción de anticuerpo del mismo, donde el anticuerpo se deriva o se une a una o más moléculas funcionales (por ejemplo, otro péptido o proteína). Por ejemplo, un anticuerpo marcado puede derivarse uniendo funcionalmente un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de cualquier otra manera) a una o más entidades moleculares, tal como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente farmacéutico, una proteína o péptido que puede mediar en la asociación del anticuerpo o la porción de anticuerpo con otra molécula (tal como una región central de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina) y/o un agente citotóxico o terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor mitótico, un antibiótico antitumoral, un agente inmunomodulador, un vector para terapia génica, un agente alquilante, un agente antiangiogénico, un antimetabolito, un agente que contiene boro, un agente quimioprotector, una hormona, un agente antihormonas, un corticosteroide, un agente terapéutico fotoactivo, un oligonucleótido, un agente radionúclido, un inhibidor de la topoisomerasa, un inhibidor de la quinasa, una radiosensibilizador y una de sus combinaciones.

Los agentes detectables útiles con los que puede derivatizarse un anticuerpo o una porción de anticuerpo del mismo incluyen los compuestos fluorescentes. Los agentes detectables fluorescentes ejemplares incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Un anticuerpo también puede derivatizarse con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa y similares. Cuando un anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, se detecta agregando reactivos adicionales que la enzima usa para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de

hidrógeno y diaminobencidina conduce a un producto de reacción coloreado, que es detectable. Un anticuerpo también puede derivatizarse con biotina y detectarse mediante la medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.

5 En una modalidad, el anticuerpo de la invención se conjuga con un agente de formación de imágenes. Los ejemplos de agentes de formación de imágenes que pueden usarse en las composiciones y métodos descritos en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, un radiomarcador (por ejemplo, indio), una enzima, un marcador fluorescente, un marcador luminiscente, un marcador bioluminiscente, un marcador magnético, y biotina.

10 En una modalidad, los anticuerpos o ADC están unidos a un radiomarcador, tal como, pero que no se limita a, indio (^{111}In). El ^{111}In puede usarse para marcar los anticuerpos y ADC descritos en la presente descripción para su uso en la identificación de tumores positivos para B7-H3. En una cierta modalidad, los anticuerpos anti-B7-H3 (o ADC) descritos en la presente descripción se marcan con ^{111}I mediante un quelante bifuncional que es un quelato de ácido ciclohexil dietilentriaminopentaacético (DTPA) bifuncional (véanse las Patentes de EE. UU. Núm. 5,124,471; 5,434,287; y 5,286,850).

Otra modalidad de la invención proporciona una proteína de unión glicosilada en donde el anticuerpo anti-B7-H3 o la porción de unión a antígeno del mismo comprende uno o más residuos de carbohidrato. La producción *in vivo* de proteínas nacientes puede sufrir un procesamiento adicional, conocido como modificación postraduccional. En particular, los residuos de azúcar (glicosilo) pueden añadirse enzimáticamente, un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que llevan cadenas laterales de oligosacáridos unidas covalentemente se conocen como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Los anticuerpos son glicoproteínas con uno o más residuos de carbohidratos en el dominio Fc, así como también en el dominio variable. Los residuos de carbohidratos en el dominio Fc tienen un efecto importante sobre la función efectora del dominio Fc, con un efecto mínimo sobre la unión al antígeno o la vida media del anticuerpo (R. Jefferis, *Biotechnol. Prog.* 21 (2005), páginas 11-16). Por el contrario, la glicosilación del dominio variable puede tener un efecto sobre la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. La glicosilación en el dominio variable puede tener un efecto negativo sobre la afinidad de unión del anticuerpo, probablemente debido al impedimento estérico (Co, M.S., y otros, *Mol. Immunol.* (1993) 30:1361-1367), o dar como resultado una mayor afinidad por el antígeno (Wallick, S.C., y otros, *Exp. Med.* (1988) 168:1099-1109; Wright, A., y otros, *EMBO J.* (1991) 10:2717-2723).

Un aspecto de la invención está dirigido a generar mutantes en el sitio de glicosilación en los que se ha mutado el sitio de glicosilación unido a O o a N de la proteína de unión. Un experto en la técnica puede generar tales mutantes mediante el uso de tecnologías estándar bien conocidas. Los mutantes del sitio de glicosilación que retienen la actividad biológica, pero tienen una actividad de unión aumentada o disminuida, son otro objeto de la invención.

En otra modalidad más, se modifica la glicosilación del anticuerpo anti-B7-H3 o la porción de unión al antígeno de la invención. Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo sin glicosilación (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos que den como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de la región variable para eliminar de ese modo la glicosilación en ese sitio. Tal no glicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tal enfoque se describe con más detalle en la Solicitud PCT WO2003016466A2 y las Patentes de EE. UU. Núm. 5.714.350 y 6.350.861.

Adicional o alternativamente, puede prepararse un anticuerpo anti-B7-H3 modificado de la invención que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tenga estructuras de GlcNAc bisectantes aumentadas. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con una maquinaria de glicosilación alterada. Se han descrito en la técnica células con maquinaria de glicosilación alterada y pueden usarse como células huésped en las que se puedan expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de ese modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Véase, por ejemplo, Shields, R. L. y otros, (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740; Umana y otros, (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-1, así como también, la Patente Europea Núm: EP 1,176,195; las Solicitudes PCT WO 03/035835; WO 99/54342 80.

La glicosilación de proteínas depende de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés, así como también de la célula huésped en la que se expresa la proteína. Diferentes organismos pueden producir diferentes enzimas de glicosilación (por ejemplo, glicosiltransferasas y glicosidasas) y tener diferentes sustratos (azúcares nucleotídicos) disponibles. Debido a tales factores, el patrón de glicosilación de proteínas y la composición de los residuos glicosilo pueden diferir en dependencia del sistema huésped en el que se expresa la proteína particular. Los residuos glicosilo útiles en la invención pueden incluir, pero no se limitan a, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, n-acetilglucosamina y ácido siálico. Preferentemente, la proteína de unión glicosilada comprende residuos de glicosilo de manera que el patrón de glicosilación es humano.

Una glicosilación de proteínas diferente puede dar como resultado características diferentes de las proteínas. Por ejemplo, la eficacia de una proteína terapéutica producida en un microorganismo huésped, tal como una levadura, y glicosilada mediante el uso de la vía endógena de la levadura, puede reducirse en comparación con la de la misma proteína expresada en una célula de mamífero, tal como una línea celular CHO. Tales glicoproteínas también pueden ser inmunogénicas en humanos y mostrar una vida media reducida *in vivo* después de la administración. Los receptores específicos en humanos y otros animales pueden reconocer residuos glicosilo específicos y promover la rápida eliminación de la proteína del torrente sanguíneo. Otros efectos adversos pueden incluir cambios en el plegamiento de proteínas, solubilidad, susceptibilidad a las proteasas, tráfico, transporte, compartimentación, secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad o alergenidad. Por consiguiente, un médico puede preferir una proteína terapéutica con una composición y un patrón de glicosilación específicos, por ejemplo, una composición y un patrón de glicosilación idénticos, o al menos similares, a los producidos en células humanas o en las células específicas de especie del sujeto animal pretendido.

La expresión de proteínas glicosiladas diferentes de las de una célula huésped puede lograrse al modificar genéticamente la célula huésped para expresar enzimas de glicosilación heterólogas. Mediante el uso de técnicas recombinantes, un médico puede generar anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos que exhiben glicosilación de proteínas humanas. Por ejemplo, las cepas de levadura se han modificado genéticamente para expresar enzimas de glicosilación no naturales, de manera que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en estas cepas de levadura exhiben una glicosilación de proteínas idéntica a la de las células animales, especialmente las células humanas (Solicitudes de Patente de EE. UU. Núm. 20040018590 y 20020137134 y Solicitud PCT WO2005100584 A2).

Los anticuerpos pueden producirse mediante varias técnicas. Por ejemplo, la expresión a partir de células huésped, en donde el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula huésped mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es posible expresar anticuerpos en células huésped procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas es preferible, y con la máxima preferencia en células huésped de mamíferos, porque tales células eucariotas (y en particular células de mamíferos) tienen más probabilidades que las células procariotas de ensamblar y secretar un anticuerpo inmunológicamente activo y debidamente plegado.

Las células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención incluyen las de ovario de hámster chino (células CHO) (incluidas las células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describió en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpos en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen al cultivar las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, con mayor preferencia, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se cultivan las células huésped. Los anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo mediante el uso de los métodos estándar de purificación de proteínas.

Las células huésped también pueden usarse para producir fragmentos de anticuerpos funcionales, tales como fragmentos Fab o moléculas scFv. Debe entenderse que las variaciones del procedimiento anterior están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que codifica fragmentos funcionales de la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de esta invención. La tecnología de ADN recombinante también puede usarse para eliminar parte o la totalidad del ADN que codifica una o ambas cadenas ligeras y pesadas que no es necesaria para unirse a los antígenos de interés. Las moléculas expresadas a partir de tales moléculas de ADN truncado también están incluidas en los anticuerpos de la invención. Además, pueden producirse anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo de la invención y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno distinto de los antígenos de interés al reticular un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo por métodos de reticulación química estándar.

En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en las células dhfr-CHO mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, cada uno de los genes de la cadena ligera y pesada del anticuerpo está ligado operativamente a elementos reguladores del potenciador/AdMLP del promotor de CMV para impulsar altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector mediante el uso de selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se usan técnicas estándar de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Además, la invención proporciona un método para sintetizar un anticuerpo recombinante de la invención al cultivar una célula huésped en un medio de cultivo adecuado hasta que se sintetiza un anticuerpo recombinante. Los anticuerpos

recombinantes de la invención pueden producirse mediante el uso de moléculas de ácido nucleico correspondientes a las secuencias de aminoácidos descritas en la presente descripción. El método puede comprender además aislar el anticuerpo recombinante del medio de cultivo.

Los extremos N y C de las cadenas polipeptídicas de anticuerpos de la presente invención pueden diferir de la secuencia esperada debido a modificaciones postraduccionales comúnmente observadas. Por ejemplo, los residuos C-terminal de lisina a menudo faltan en las cadenas pesadas de anticuerpos. Dick y otros, (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132. Los residuos N-terminal de glutamina y, en menor medida, los residuos de glutamato, se convierten con frecuencia en residuos de piroglutamato en las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos terapéuticos. Dick y otros, (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97:544; Liu y otros, (2011) *JBC* 286:11211; Liu y otros, (2011) *J. Biol. Chem.* 286:11211.

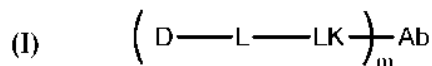
II. Conjugados Anticuerpo-Fármaco anti-B7-H3 (ADC)

Los anticuerpos anti-B7-H3 descritos en la presente descripción pueden conjugarse con un resto de fármaco para formar un Conjugado Anticuerpo-Fármaco anti-B7-H3 (ADC). Los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) pueden aumentar la eficacia terapéutica de los anticuerpos en el tratamiento de enfermedades, por ejemplo, cáncer, debido a la capacidad del ADC para administrar selectivamente uno o más grupos farmacológicos a los tejidos diana, tal como un antígeno asociado al tumor, por ejemplo, tumores que expresan B7-H3. Por tanto, la invención proporciona un ADC anti-B7-H3 para uso terapéutico, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer.

Los ADC anti-B7-H3 de la invención comprenden un anticuerpo anti-B7-H3, es decir, un anticuerpo que se une específicamente a B7-H3, unido a 2 restos de fármaco. La especificidad del ADC se define por la especificidad del anticuerpo, es decir, anti-B7-H3.

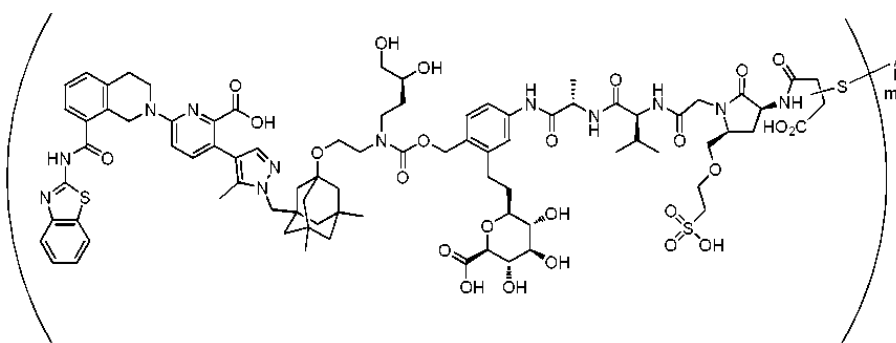
Los términos "fármaco", "agente" y "resto de fármaco" se usan indistintamente en la presente descripción. Los términos "unido" y "conjugado" también se usan indistintamente en la presente descripción e indican que el anticuerpo y el resto están unidos covalentemente.

En la presente invención, el ADC de las reivindicaciones tiene la siguiente fórmula general (fórmula I):



en donde Ab es el anticuerpo, (L) es un enlazador, (D) es un fármaco y LK representa un enlace covalente que enlaza el enlazador L al anticuerpo Ab; y m es 2. El DAR de un ADC es equivalente a la "m" referida en la Fórmula I.

En la presente invención, el ADC es:



en donde m es 2 y Ab es un anticuerpo anti-hB7-H3, en donde el anticuerpo Ab comprende un dominio CDR3 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35, un dominio CDR2 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34, y un dominio CDR1 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33; y un dominio CDR3 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 39, un dominio CDR2 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 38 y un dominio CDR1 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 37.

III. A. ADC anti-B7-H3: Inhibidores de Bcl-xL, Enlazadores, Sintones, y Métodos de Fabricación de Estos

Las vías apoptóticas desreguladas también se han implicado en la patología del cáncer. La implicación de que la apoptosis regulada negativamente (y más particularmente la familia de proteínas Bcl-2) está involucrada en la

aparición de malignidad cancerosa ha revelado una nueva forma de dirigirse a esta enfermedad aún esquivada. La investigación ha demostrado, por ejemplo, que las proteínas antiapoptóticas, Bcl 2 y Bcl-xL, se sobreexpresan en muchos tipos de células cancerosas. Véase, Zhang, 2002, *Nature Reviews/Drug Discovery* 1:101; Kirkin y otros, 2004, *Biochimica Biophysica Acta* 1644:229-249; y Amundson y otros, 2000, *Cancer Research* 60:6101-6110. El efecto de esta desregulación es la supervivencia de células alteradas que de cualquier otra manera habrían sufrido apoptosis en condiciones normales. Se cree que la repetición de estos defectos asociados con la proliferación no regulada es el punto de partida de la evolución cancerosa.

La descripción se refiere a los ADC anti-hB7-H3 que comprenden un anticuerpo anti-hB7-H3 conjugado con un fármaco mediante un enlazador, en donde el fármaco es un inhibidor de Bcl-xL como se definió en la reivindicación 1.

III.A.1. Inhibidores de Bcl-xL

Un aspecto de la presente descripción se refiere a los inhibidores de Bcl-xL que tienen baja permeabilidad celular. Los compuestos son generalmente de naturaleza heterocíclica e incluyen uno o más grupos solubilizantes que imparten a los compuestos una alta solubilidad en agua y baja permeabilidad celular. Los grupos solubilizantes son generalmente grupos que son capaces de formar puentes de hidrógeno, formar interacciones dipolo-dipolo y/o que incluyen un polímero de polietilenglicol que contiene de 1 a 30 unidades, uno o más polioles, una o más sales, o uno o más grupos que se cargan a pH fisiológico.

Los inhibidores de Bcl-xL se unen e inhiben las proteínas antiapoptóticas Bcl-xL, lo que induce la apoptosis. La capacidad de los inhibidores específicos de Bcl-xL para unirse e inhibir la actividad de Bcl-xL puede confirmarse en ensayos de unión y actividad estándar, incluidos, por ejemplo, los ensayos de unión de TR-FRET Bcl-xL descritos en Tao y otros, 2014, *ACS Med. Chem. Lett.*, 5:1088-1093. En el Ejemplo 4, más abajo, se proporciona un ensayo de unión de TR-FRET Bcl-xL específico que puede usarse para confirmar la unión de Bcl-xL. Típicamente, los inhibidores de Bcl-xL útiles como inhibidores *per se* y en los ADC descritos en la presente descripción exhibirán una K_i en el ensayo de unión del Ejemplo 5 de menos de aproximadamente 1 nM, pero pueden exhibir una K_i significativamente menor, por ejemplo, una K_i de menos de aproximadamente 1, 0,1 o incluso 0,01 nM.

La actividad inhibidora de Bcl-xL también puede confirmarse en ensayos de citotoxicidad basados en células estándar, tal como los ensayos de citotoxicidad celular FL5.12 y Molt-4 descritos en Tao y otros, 2014, *ACS Med. Chem. Lett.*, 5:1088-1093. En los Ejemplos 5 y 6, a continuación, se proporciona un ensayo de citotoxicidad celular Molt-4 específico que puede usarse para confirmar la actividad inhibidora de Bcl-xL de inhibidores específicos de Bcl-xL que pueden penetrar las membranas celulares. Típicamente, tales inhibidores de Bcl-xL en células permeables exhibirán una EC_{50} de menos de aproximadamente 500 nM en el ensayo de citotoxicidad Molt-4 de los Ejemplos 5 y 6, pero pueden exhibir un disminuir significativamente EC_{50} , por ejemplo, una EC_{50} de menos de aproximadamente 250, 100, 50, 20, 10 o incluso 5 nM.

Debido a la presencia de grupos solubilizantes, se espera que muchos de los inhibidores de Bcl-xL descritos en la presente descripción, presenten una permeabilidad celular baja o muy baja y, por lo tanto, no produzcan una actividad significativa en ciertos ensayos celulares debido a la incapacidad del compuesto para atravesar la membrana de la célula, incluido el ensayo de toxicidad celular Molt-4 de los Ejemplos 5 y 6. La actividad inhibidora de Bcl-xL de los compuestos que no atraviesan libremente las membranas celulares puede confirmarse en ensayos celulares con células permeabilizadas. El proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) está controlado por las proteínas de la familia Bcl-2. Específicamente, la MOMP es promovida por las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 Bax y Bak que, tras la activación, se oligomerizan en la membrana mitocondrial externa y forman poros, lo que conduce a la liberación del citocromo c (cyt c). La liberación del cyt c desencadena la formulación del apoptosoma que, a su vez, da como resultado la activación de la caspasa y otros eventos que obligan a la célula a sufrir una muerte celular programada (véase, Goldstein y otros, 2005, *Cell Death and Differentiation* 12:453-462). La acción de oligomerización de Bax y Bak es antagonizada por los miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, incluidos Bcl-2 y Bcl-xL. Los inhibidores de Bcl-xL, en células que dependen de Bcl-xL para sobrevivir, pueden provocar la activación de Bax y/o Bak, MOMP, liberación del cyt c y eventos posteriores que conducen a la apoptosis. El proceso de liberación del cyt c puede medirse mediante transferencia de Western de fracciones de células tanto mitocondriales como citosólicas y usarse como medida indirecta de la apoptosis en las células.

Como un medio para detectar la actividad inhibidora de Bcl-xL y la consiguiente liberación del cyt c para inhibidores de Bcl-xL con baja permeabilidad celular, las células pueden tratarse con un agente que provoca la formación selectiva de poros en la membrana plasmática, pero no en la mitocondrial. Específicamente, la relación colesterol/fosfolípidos es mucho más alta en la membrana plasmática que en la membrana mitocondrial. Como resultado, una incubación corta con concentraciones bajas del detergente digitonina dirigido por colesterol permeabiliza selectivamente la membrana plasmática sin afectar significativamente a la membrana mitocondrial. Este agente forma complejos insolubles con el colesterol que conducen a la segregación del colesterol de sus sitios normales de unión a los fosfolípidos. Esta acción, a su vez, conduce a la formación de agujeros de aproximadamente 40-50 Å de ancho en la bicapa lipídica. Una vez que la membrana plasmática está

permeabilizada, los componentes citosólicos capaces de pasar por los agujeros formados por la digitonina pueden eliminarse por lavado, incluido el citocromo C que se liberó de las mitocondrias al citosol en las células apoptóticas (Campos, 2006, *Citometry A* 69(6):515-523).

Típicamente, los inhibidores de Bcl-XL rendirán una EC_{50} de menos de aproximadamente 10 nM en el ensayo con cyt c permeabilizado en células Molt-4 de los Ejemplos 5 y 6, aunque los compuestos pueden exhibir significativamente un menor EC_{50} , por ejemplo, menos de aproximadamente 5, 1 o incluso 0,5 nM. Como se demuestra en el Ejemplo 6, los inhibidores de Bcl-xL que tienen una permeabilidad celular baja o muy baja que no muestran actividad en el ensayo de toxicidad celular estándar con Molt-4 con células no permeables exhiben una potente actividad funcional, medida por la liberación del cyt c, en los ensayos de citotoxicidad celular con células permeabilizadas. Además de la liberación del citocromo c, las mitocondrias que sufren apoptosis pierden con frecuencia su potencial de membrana mitocondrial transmembrana (Bouchier-Hayes y otros, 2008, *Methods* 44(3): 222-228). JC-1 es un colorante catiónico de carbocianina que se acumula en las mitocondrias y se vuelve rojo fluorescente cuando las mitocondrias están sanas y se pierde cuando la membrana mitocondrial está comprometida (por ciento de despolarización; Smiley y otros, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3671-3675; Reers y otros, 1991: *Biochemistry*, 30: 4480-4486). Esta pérdida de señal puede detectarse en células permeabilizadas mediante el uso de un fluorímetro (excitación 545 nm y emisión de 590 nm) y, por lo tanto, es totalmente cuantitativa, mejorando tanto la reproducibilidad como el rendimiento. Típicamente, los inhibidores de Bcl-XL rendirán una EC_{50} de menos de aproximadamente 10 nM en el ensayo JC-1 permeabilizado en células Molt-4 de los Ejemplos 5 y 6, aunque los compuestos pueden exhibir significativamente un menor EC_{50} , por ejemplo, menos de aproximadamente 5, 1, 0,5 o incluso 0,05 nM. Como se demuestra en el Ejemplo 6, los inhibidores de Bcl-xL que tienen una permeabilidad celular baja o muy baja que no exhiben actividad en el ensayo de toxicidad celular estándar con Molt-4 con células no permeables exhiben una potente actividad funcional, medida por su pérdida del potencial de membrana mitocondrial transmembrana en el ensayo JC-1, en ensayos de citotoxicidad celular con células permeabilizadas. Los inhibidores de Bcl-xL de baja permeabilidad también exhiben una potente actividad cuando se administran a las células en forma de ADC

Aunque muchos de los inhibidores de Bcl-xL de la presente descripción inhiben selectiva o específicamente Bcl-xL sobre otras proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, no es necesaria la inhibición selectiva y/o específica de Bcl-xL. Los inhibidores de Bcl-xL y los ADC que comprenden los compuestos también pueden, además de inhibir Bcl-xL, inhibir una o más de otras proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2, tales como, por ejemplo, Bcl-2. En algunas modalidades, los inhibidores de Bcl-xL y/o ADC son selectivos y/o específicos para Bcl-xL. Por específico o selectivo se entiende que el inhibidor de Bcl-xL y/o ADC particular se une o inhibe Bcl-xL en mayor medida que Bcl-2 en condiciones de ensayo equivalentes. En modalidades específicas, los inhibidores de Bcl-xL y/o ADC exhiben en el intervalo de aproximadamente 10 veces, 100 veces o incluso mayor especificidad o selectividad para Bcl-xL que Bcl-2 en ensayos de unión.

III.A.2. Enlazadores Bcl-xL

En los ADC descritos en la presente descripción, los inhibidores de Bcl-xL se unen al anticuerpo mediante enlazadores.

Como apreciarán los expertos en la materia, los enlazadores unen los inhibidores de Bcl-xL al anticuerpo formando un enlace covalente al inhibidor de Bcl-xL en un lugar y un enlace covalente al anticuerpo en otro. Los enlaces covalentes se forman por reacción entre grupos funcionales en el enlazador y grupos funcionales en los inhibidores y el anticuerpo. Como se usa en la presente descripción, la expresión "enlazador" pretende incluir (i) formas no conjugadas del enlazador que incluyen un grupo funcional capaz de unir covalentemente el enlazador a un inhibidor de Bcl-xL y un grupo funcional capaz de enlazar covalentemente el enlazador a un anticuerpo; (ii) formas parcialmente conjugadas del enlazador que incluyen un grupo funcional capaz de unir covalentemente el enlazador a un anticuerpo y que está enlazado covalentemente a un inhibidor de Bcl-xL, o viceversa; y (iii) formas completamente conjugadas del enlazador que está unido covalentemente tanto a un inhibidor de Bcl-xL como a un anticuerpo.

III.A.3. Sintones Bcl-xL ADC

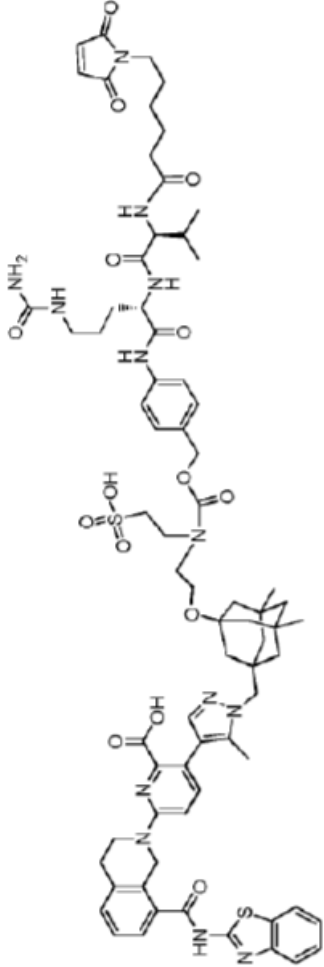
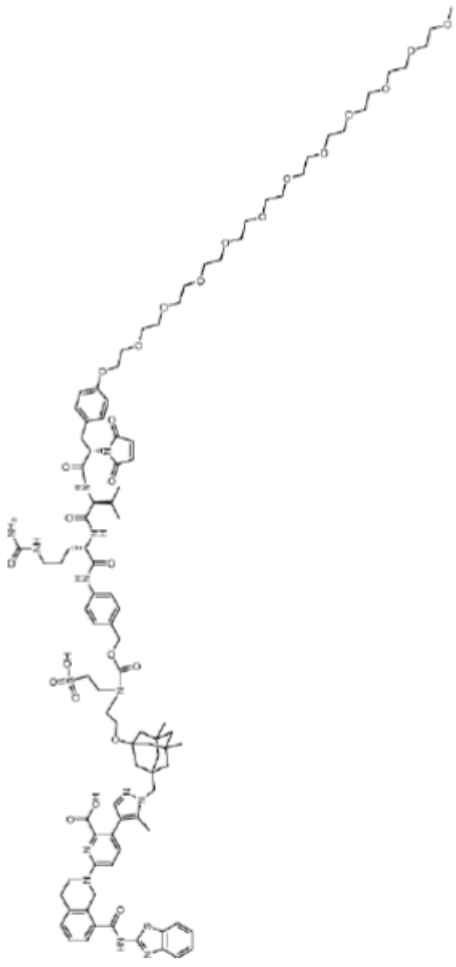
Los sintones conjugados de anticuerpo-fármaco son intermediarios sintéticos que se utilizan para formar los ADC. Los sintones son generalmente compuestos de acuerdo con la fórmula estructural (III):



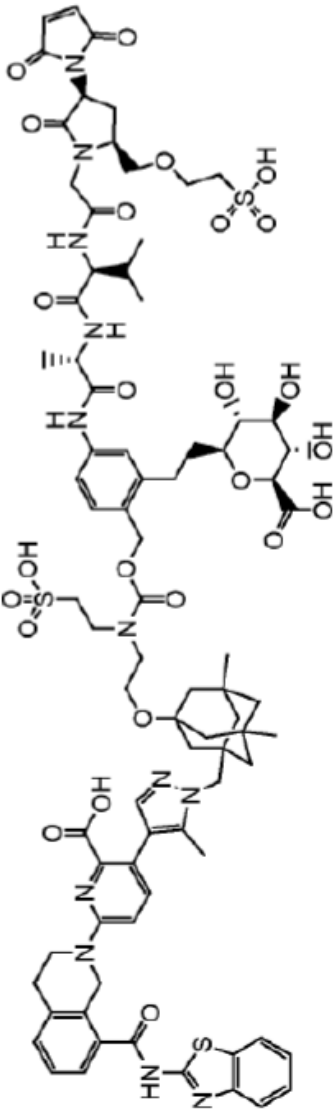
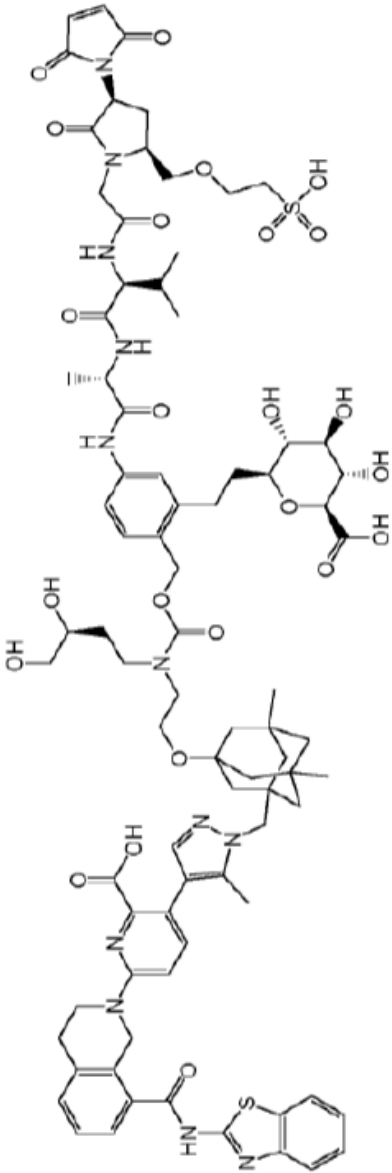
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde D es un inhibidor de Bcl-xL como se describió anteriormente, L es un enlazador como se describió anteriormente y R^x es un grupo reactivo adecuado para unir el sintón a un anticuerpo.

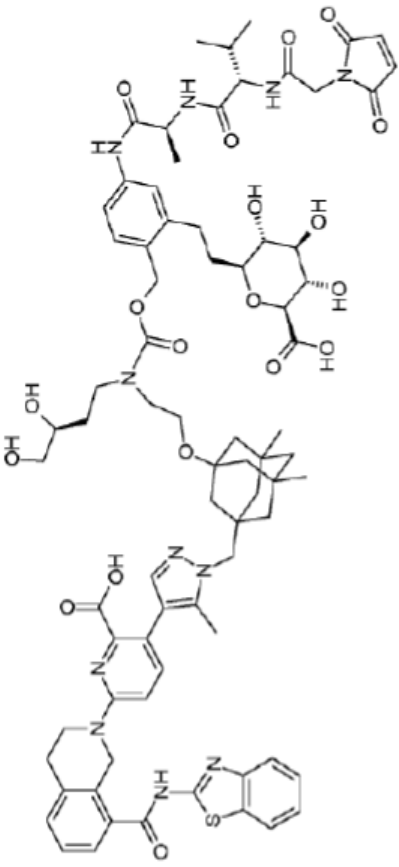
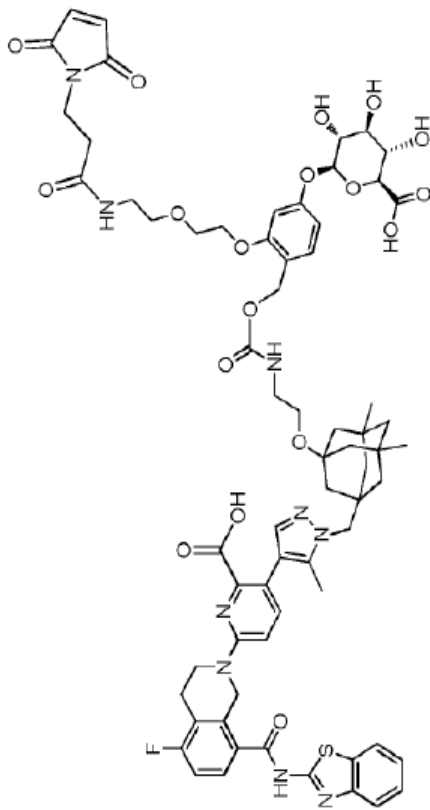
Los sintones usados en los Ejemplos de la presente solicitud se enumeran a continuación en la Tabla B. El sintón de la presente invención es el Ejemplo Núm. 2.166 (AAA).

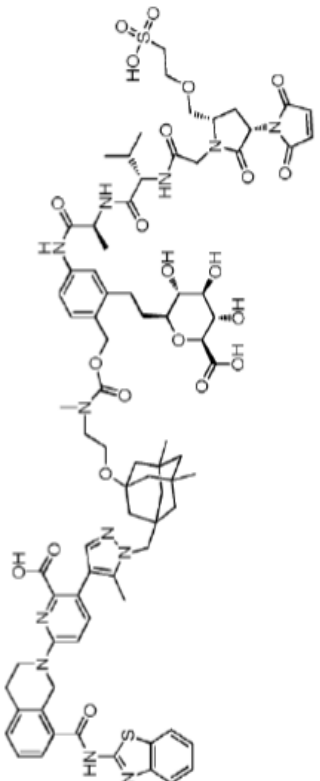
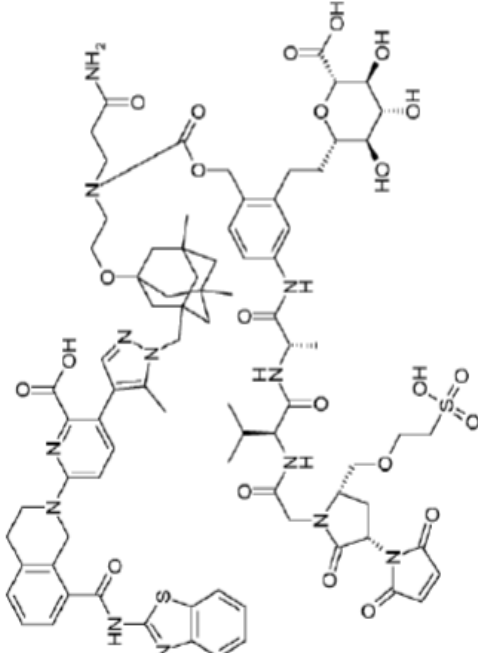
Tabla B

| Ejemplo Núm. | Código del Sintón | Estructura del Sintón |
|--------------|-------------------|---|
| 2.1 | CZ |  |
| 2.122 | TV |  |

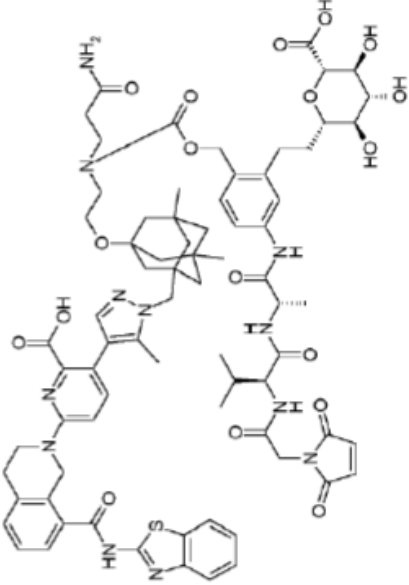
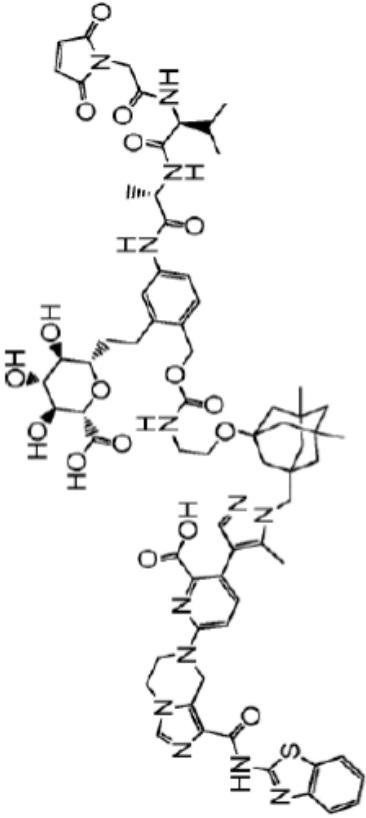
(continuación)

| Ejemplo Núm. | Código del Sintón | Estructura del Sintón |
|-----------------|----------------------|---|
| 2.130 | TX |  |
| 2.166 | AAA |  |

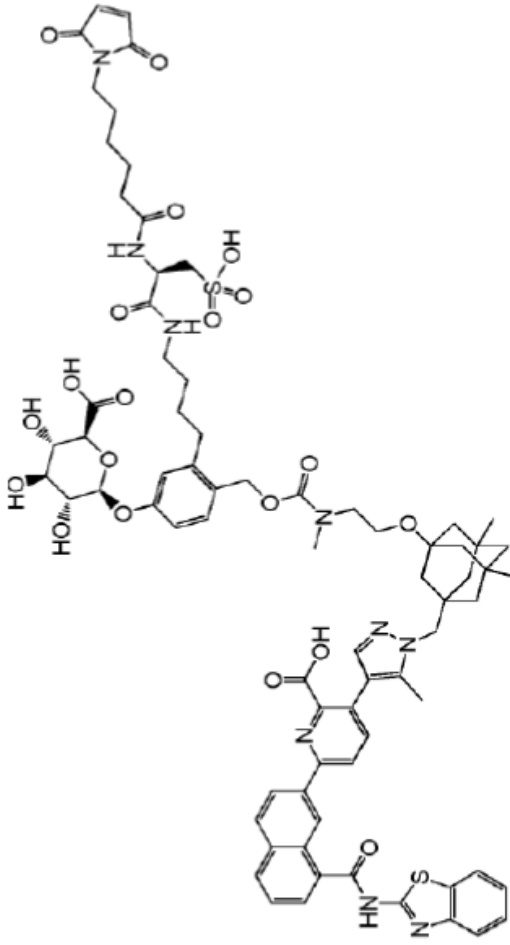
| Ejemplo Núm. | Código del Sintón | Estructura del Sintón |
|--------------------|----------------------|---|
| 2.167 | AAD |  |
| 2.177 (control) | LB |  |

| Ejemplo Núm. | Código del Síntón | Estructura del Síntón |
|--------------------|----------------------|---|
| 2.178 (control) | WD |  |
| 2.179 (control) | ZZ |  |

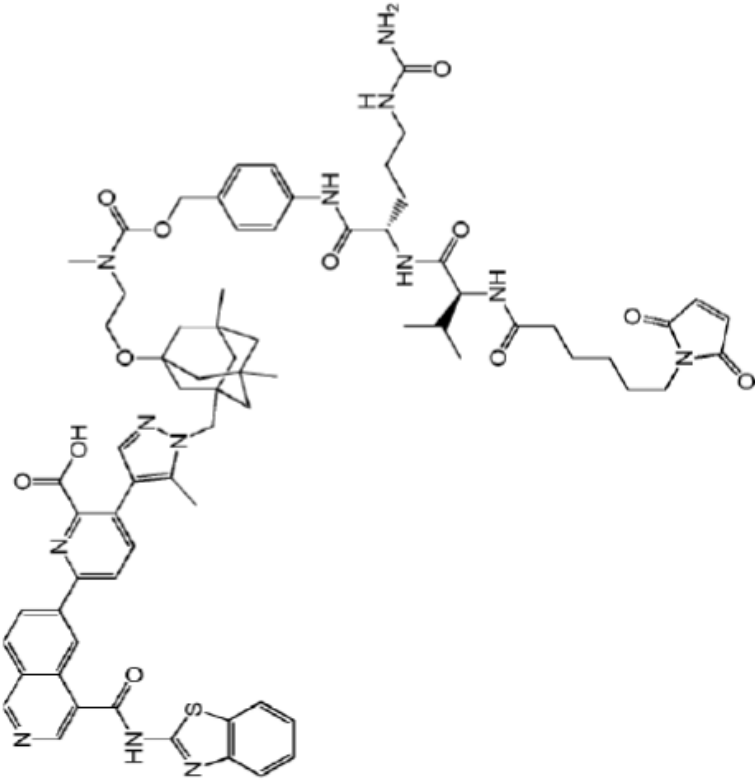
(continuación)

| Ejemplo Núm. | Código del Sintón | Estructura del Sintón |
|--------------------|----------------------|---|
| 2.180 (control) | ZT |  |
| 2.181 (control) | XW |  |

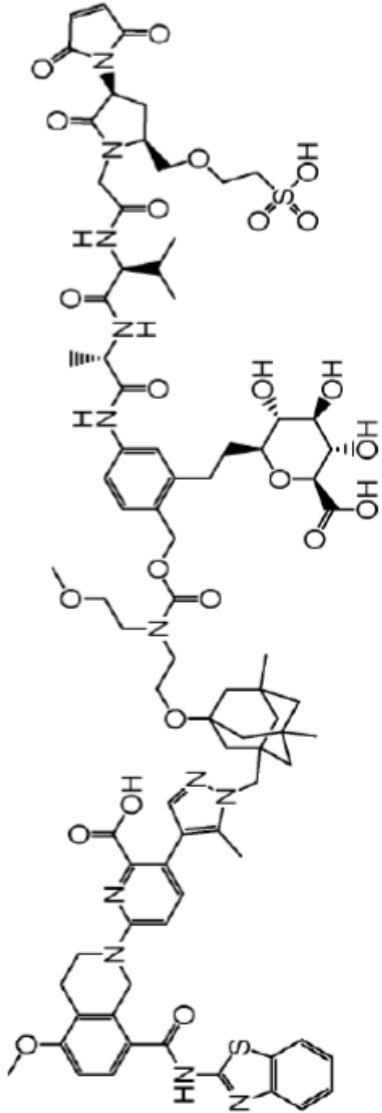
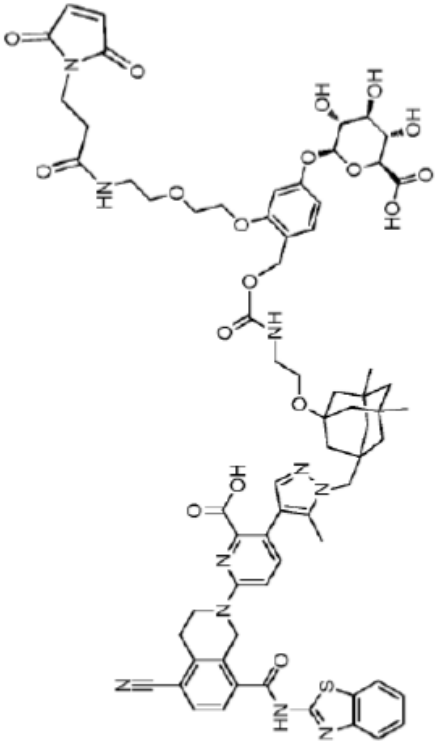
(continuación)

| Ejemplo Núm. | Código del Sintón | Estructura del Sintón |
|--------------------|----------------------|--|
| 2.182 (control) | SE |  |

(continuación)

| Ejemplo Núm. | Código del Sintón | Estructura del Sintón |
|--------------------|----------------------|---|
| 2.183 (control) | SR |  |

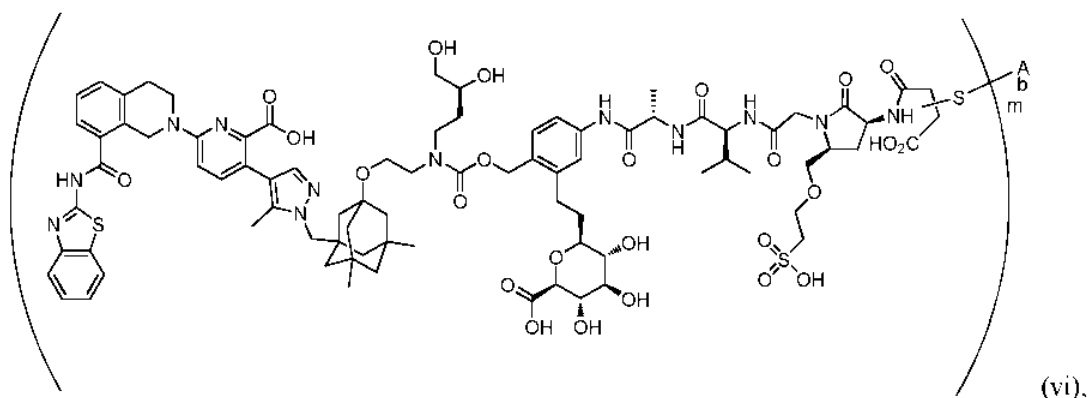
(continuación)

| Ejemplo Núm. | Código del Síntón | Estructura del Síntón |
|--------------------|----------------------|---|
| 2.184 (control) | YG |  |
| 2.185 (control) | KZ |  |

En la presente invención, el sintón es 2.166 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El nombre del compuesto del sintón se proporciona más abajo:

ácido 6-(8-(benzo[d]tiazol-2-ilcarbamoil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-3-(1-((3-(2-(((2-(2-((2S,3R,4R,5S,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-il)etilo)-4-((S)-2-((S)-2-(2-((3S,5S)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2-oxo-5-((2-sulfoetoxi)metil)pirrolidin-1-il)acetamido)-3-metilbutanamido)propanamido)bencil)oxi)carbonil)((S)-3,4-dihidroxibutil)amino)etoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)picolínico;

En la presente invención, el ADC, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, es:



en donde m es 2, Ab es un anticuerpo anti-hB7-H3, en donde el anticuerpo anti-hB7-H3 comprende un dominio CDR3 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35, un dominio CDR2 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34, y un dominio CDR1 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33; y un dominio CDR3 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 39, un dominio CDR2 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 38, y un dominio CDR1 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 37; o un anticuerpo anti-hB7-H3, en donde el anticuerpo anti-hB7H3 comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 147, y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 144; o un anticuerpo anti-hB7-H3, en donde el anticuerpo anti-hB7-H3 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 168, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 169.

Los inhibidores de Bcl-xL, incluidas las ojivas y los sintones, y los métodos para fabricarlos, se describen en el documento US 2016/0339117 (AbbVie Inc.).

III.A.4. Métodos de Síntesis de los ADC Bcl-xL

Los inhibidores y sintones de Bcl-xL descritos en la presente descripción pueden sintetizarse mediante el uso de técnicas estándar conocidas de química orgánica. En la sección de Ejemplos se proporcionan los métodos específicos para sintetizar inhibidores y sintones de Bcl-xL ilustrativos que pueden ser útiles como guía.

Pueden encontrarse ejemplos de los inhibidores de Bcl-xL, enlazadores y sintones de los mismos, así como también los métodos para fabricar los mismos, en la Solicitud de Patente de EE. UU. Núm. US 2016/0339117.

En la sección de Ejemplos se proporcionan los métodos específicos para sintetizar los ADC ilustrativos descritos en la presente descripción.

III.A.7. Métodos Generales para Sintetizar los ADC anti-B7-H3

La presente invención también describe un proceso para preparar un ADC anti-B7-H3 de la invención que comprende:

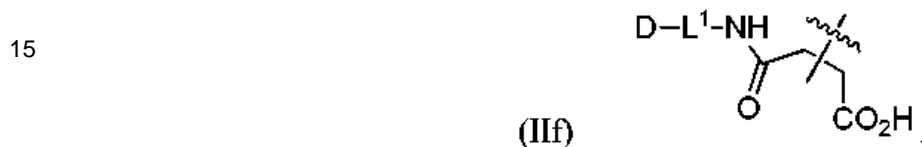
- tratar un anticuerpo en una solución acuosa con una cantidad efectiva de un agente reductor de disulfuro a 30-40 °C durante al menos 15 minutos, y luego enfriar la solución del anticuerpo a 20-27 °C;
- añadir a la solución de anticuerpo reducido una solución de agua/dimetilsulfóxido que comprende sintón 2.166 (Tabla B); ajustar el pH de la solución a un pH de 7,5 a 8,5;
- dejar que la reacción se desarrolle durante 48 a 80 horas para formar el ADC;
- en donde la masa se desplaza en 18 ± 2 amu por cada hidrólisis de una succinimida a succinamida medida por espectrometría de masas por pulverización de electrones; y

en donde el ADC se purifica opcionalmente mediante cromatografía de interacción hidrófoba.

En determinadas modalidades, el anticuerpo es huAb13v1.

- 5 La presente invención también está dirigida a un ADC anti-B7-H3 preparado mediante el proceso descrito anteriormente.

En determinadas modalidades, el ADC anti-B7-H3 descrito en la presente solicitud se forma al poner en contacto un anticuerpo que se une a un receptor de la superficie celular hB7-H3 o un antígeno asociado a un tumor expresado en una célula tumoral con un sintón enlazador de fármacos en condiciones en las que el sintón enlazador de fármaco se une covalentemente al anticuerpo a través de un resto de maleimida como se muestra en las fórmulas (II_f).



20 en donde D es el fármaco inhibidor de Bcl-xL y L¹ es la porción del enlazador no formado a partir de la maleimida; y en donde el sintón enlazador de fármaco es el ejemplo 2.166 (Tabla B), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

III. Purificación de los ADC anti-B7-H3

25 La purificación de los ADC puede lograrse de tal manera que se recopilen los ADC que tienen ciertos DAR. Por ejemplo, la resina HIC puede usarse para separar los ADC con alto contenido de fármaco de los ADC que tienen proporciones óptimas de fármaco a anticuerpo (DAR), por ejemplo, un DAR de 4 o menos. Se añade una resina hidrófoba a una mezcla de ADC de manera que los ADC no deseados, es decir, los ADC cargados con más fármaco, se unen a la resina y puedan eliminarse selectivamente de la mezcla. La separación de los ADC puede lograrse poniendo en contacto una mezcla de ADC (por ejemplo, una mezcla que comprende una especie de ADC cargada con un fármaco de 4 o menos y una especie de ADC cargada con un fármaco de 6 o más) con una resina hidrófoba, en donde la cantidad de resina es suficiente para permitir la unión de la especie cargada con el fármaco que se está eliminando de la mezcla de ADC. La resina y la mezcla de ADC se mezclan, de manera que la especie de ADC que se elimina (por ejemplo, una especie cargada con un fármaco de 6 o más) se une a la resina y puede separarse de las otras especies de ADC en la mezcla de ADC. La cantidad de resina usada en el método se basa en una relación en peso entre la especie a eliminar y la resina, donde la cantidad de resina usada no permite una unión significativa de la especie cargada de fármaco que se desea. Por tanto, pueden usarse los métodos para reducir el DAR medio a menos de 4. Además, los métodos de purificación descritos en la presente descripción pueden usarse para aislar los ADC que tengan cualquier intervalo deseado de especies cargadas con fármaco, por ejemplo, una especie cargada con un fármaco de 4 o menos, una especie cargada con un fármaco de 3 o menos, una especie cargada con un fármaco de 2 o menos, una especie cargada con un fármaco de 1 o menos.

45 Determinadas especies de moléculas se unen a una superficie en base a interacciones hidrófobas entre las especies y una resina hidrófoba. En una modalidad de la presente descripción, el método se refiere a un proceso de purificación que se basa en la mezcla de una resina hidrófoba y una mezcla de ADC, en donde la cantidad de resina añadida a la mezcla determina qué especies (por ejemplo, ADC con un DAR de 6 o más) se unirán. Después de la producción y purificación de un anticuerpo de un sistema de expresión (por ejemplo, un sistema de expresión de mamífero), el anticuerpo se reduce y se acopla a un fármaco mediante una reacción de conjugación. La mezcla de ADC resultante a menudo contiene ADC que tienen un intervalo de DAR, por ejemplo, de 1 a 8. La mezcla de ADC puede purificarse mediante el uso de un proceso, tal como, pero que no se limita a, un proceso por lotes, de manera que los ADC que tienen una especie de 2 cargados con fármaco se seleccionan y separan de los ADC que tienen una carga de fármaco más alta.

55 El método de separación de ADC descrito en la presente descripción puede realizarse mediante el uso de un método de purificación por lotes. El proceso de purificación por lotes generalmente incluye añadir la mezcla de ADC a la resina hidrófoba en un recipiente, mezclar y, posteriormente, separar la resina del sobrenadante. Por ejemplo, en el contexto de la purificación por lotes, puede prepararse una resina hidrófoba o equilibrar con el tampón de equilibrio deseado. De este modo puede obtenerse una suspensión de la resina hidrófoba. A continuación, la mezcla de ADC puede ponerse en contacto con la suspensión para adsorber las especies específicas de ADC que van a separarse mediante la resina hidrófoba. La solución que comprende los ADC deseados que no se unen al material de resina hidrófoba puede separarse entonces de la suspensión, por ejemplo, mediante filtración o dejando que la suspensión se asiente y eliminando el sobrenadante. La suspensión resultante puede someterse a una o más etapas de lavado. Para eluir los ADC unidos, puede disminuirse la concentración de sal.

65 Alternativamente, la purificación puede realizarse mediante el uso de un proceso de circulación, mediante el cual la

resina se empaqueta en un recipiente y la mezcla de ADC se pasa sobre el lecho de la resina hidrófoba hasta que se hayan eliminado las especies específicas de ADC que van a separarse. El sobrenadante (que contiene las especies de ADC deseadas) se bombea luego desde el recipiente y el lecho de resina puede someterse a etapas de lavado.

Alternativamente, puede usarse un proceso de flujo continuo para purificar una mezcla de ADC para llegar a una composición que comprende una mayoría de ADC que tienen un cierto DAR deseado. En un proceso de flujo continuo, la resina se empaqueta en un recipiente, por ejemplo, una columna, y la mezcla de ADC se pasa sobre la resina empaquetada de manera que la especie de ADC deseada no se una sustancialmente a la resina y fluya a través de la resina, y la especie de ADC no deseada se una a la resina. Un proceso de flujo continuo puede realizarse en un modo de un solo paso (donde las especies de ADC de interés se obtienen como resultado de un solo paso a través de la resina del recipiente) o en un modo de múltiples pasos (donde las especies de ADC de interés son obtenidas como resultado de múltiples pasos a través de la resina del recipiente). El proceso de flujo continuo se realiza de manera que el peso de resina seleccionada se una a la población de ADC no deseados y los ADC deseados (por ejemplo, DAR 2-4) fluyen sobre la resina y se recogen en el flujo continuo después de uno o varios pasos.

Después de un proceso de flujo continuo, la resina puede lavarse con uno o más lavados siguientes para recuperar los ADC que tengan el intervalo de DAR deseado (que se encuentra en el filtrado de lavado). Por ejemplo, pueden usarse una pluralidad de lavados que tienen una conductividad decreciente para recuperar adicionalmente los ADC que tienen el DAR de interés. El material de elución obtenido del lavado de la resina puede combinarse posteriormente con el filtrado resultante del proceso de flujo continuo para mejorar la recuperación de los ADC que tienen el DAR de interés.

Los métodos de purificación por lotes, de circulación y de flujo a través del proceso antes mencionados se basan en el uso de una resina hidrófoba para separar las especies de ADC con carga alta de fármaco frente a baja. La resina hidrófoba comprende grupos hidrófobos que interactúan con las propiedades hidrófobas de los ADC. Los grupos hidrófobos en el ADC interactúan con los grupos hidrófobos dentro de la resina hidrófoba. Cuanto más hidrófoba sea una proteína, más fuerte interactuará con la resina hidrófoba.

La resina hidrófoba normalmente comprende una matriz de base (por ejemplo, agarosa reticulada o material de copolímero sintético) a la que se acoplan ligandos hidrófobos (por ejemplo, grupos alquilo o arilo). Muchas resinas hidrófobas están disponibles comercialmente. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow con sustitución alta o baja (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); Phenyl Sepharose™ de Alto Rendimiento (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); Octil Sepharose™ de Alto Rendimiento (Farmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); Columnas Fractogel™ EMD Propil o Fractogel™ EMD Fenil (E. Merck, Alemania); Soportes de Macro-Prep™ Metil o Macro-Prep™ de t-butilo (Bio-Rad, California); WP HI-Propil (C₃)™ (J.T. Baker, Nueva Jersey); y Toyopearl™ éter, hexilo, fenilo o butilo (TosoHaas, PA). En una modalidad, la resina hidrófoba es una resina hidrófoba de butilo. En otra modalidad, la resina hidrófoba es una resina hidrófoba de fenilo. En otra modalidad, la resina hidrófoba es una resina hidrófoba de hexilo, una resina hidrófoba de octilo o una resina hidrófoba de decilo. En una modalidad, la resina hidrófoba es un polímero metacrílico que tiene ligandos n-butilo (por ejemplo, TOYOPEARL® Butil-600M).

Los métodos adicionales para purificar las mezclas de ADC para obtener una composición que tenga un DAR deseado se describen en la Solicitud de Estados Unidos Núm. 14/210,602 (Solicitud Publicación de Patente de EE. UU. Núm. US 2014/0286968).

En determinadas modalidades de la invención, los ADC descritos en la presente descripción que tienen un DAR2 se purifican a partir de los ADC que tienen DAR más altos o más bajos. Tales ADC DAR2 purificados se denominan en la presente descripción "E2". Métodos de purificación para lograr una composición que tenga ADC E2 anti-B7-H3. En una modalidad, la invención proporciona una composición que comprende una mezcla de ADC, en donde al menos el 75 % de los ADC son ADC anti-B7H3 (como los descritos en la presente descripción) que tienen un DAR2. En otra modalidad, la invención proporciona una composición que comprende una mezcla de ADC, en donde al menos el 80 % de los ADC son ADC anti-B7H3 (como los descritos en la presente descripción) que tienen un DAR2. En otra modalidad, la invención proporciona una composición que comprende una mezcla de ADC, en donde al menos el 85 % de los ADC son ADC anti-B7H3 (como los descritos en la presente descripción) que tienen un DAR2. En otra modalidad, la invención proporciona una composición que comprende una mezcla de ADC, en donde al menos el 90 % de los ADC son ADC anti-B7H3 (como los descritos en la presente descripción) que tienen un DAR2.

IV. Usos de Anticuerpos anti-B7-H3 y ADC anti-B7-H3

Los ADC de la invención preferentemente son capaces de neutralizar la actividad de la B7-H3 humana tanto *in vivo* como *in vitro*. En consecuencia, tales ADC de la invención pueden usarse para inhibir la actividad de hB7-H3, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene hB7-H3, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen B7-H3 con el que un anticuerpo de la invención reacciona de forma cruzada. En una modalidad, la invención proporciona un método para inhibir la actividad de hB7-H3 que comprende poner en contacto hB7-H3 con un ADC

de la invención de manera que se inhiba la actividad de hB7-H3. Por ejemplo, en un cultivo celular que contiene, o se sospecha que contiene hB7-H3, puede añadir un anticuerpo o una porción de anticuerpo del ADC de la invención al medio de cultivo para inhibir la actividad de hB7-H3 en el cultivo.

En otra modalidad, de la invención se describe un método para reducir la actividad de hB7-H3 en un sujeto, ventajosamente de un sujeto que padece una enfermedad o trastorno en el que la actividad de B7-H3 es perjudicial. La invención proporciona los métodos para reducir la actividad de B7-H3 en un sujeto que padece tal enfermedad o trastorno, el método que comprende administrar al sujeto un ADC de la invención de manera que se reduce la actividad de B7-H3 en el sujeto. Preferentemente, la B7-H3 es la B7-H3 humana y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que exprese un B7-H3 al que los anticuerpos de la invención son capaces de unirse. Además, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido B7-H3 (por ejemplo, mediante la administración de B7-H3 o mediante la expresión de un transgén B7-H3). Los ADC de la invención pueden administrarse a un sujeto humano con fines terapéuticos. Además, los ADCs de la invención pueden administrarse a un mamífero no humano que exprese un B7-H3 con el que el anticuerpo es capaz de unirse con fines veterinarios o como modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a lo último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, prueba de dosis y cursos de tiempo de administración).

Como se usa en la presente descripción, el término "un trastorno en el que la expresión de B7-H3 es perjudicial" pretende incluir enfermedades y otros trastornos en los que se ha demostrado que se expresa la presencia de B7-H3 en un sujeto que padece el trastorno, o se ha demostrado que es o se sospecha que es responsable de la fisiopatología del trastorno o un factor que contribuye al trastorno. Por ejemplo, los ADC de la invención pueden usarse para dirigirse a células tumorales que expresan B7-H3. Los ejemplos no limitantes de trastornos que pueden tratarse con los ADC de la invención incluyen, pero que no se limitan a, una variedad de cánceres que incluyen, entre otros, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, un glioma, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de cabeza y cuello, leucemia, por ejemplo, leucemia mieloide aguda (AML), linfoma, por ejemplo, linfoma no Hodgkin (NHL), y cáncer de riñón. Otros ejemplos de cáncer que pueden tratarse mediante el uso de las composiciones y métodos descritos en la presente descripción incluyen carcinoma de células escamosas (por ejemplo, cáncer de pulmón escamoso o cáncer de cabeza y cuello escamosos), cáncer de mama triple negativo, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer colorrectal y mesotelioma. En una modalidad, los ADC descritos en la presente descripción se usan para tratar un tumor sólido, por ejemplo, inhibir el crecimiento o disminuir el tamaño de un tumor sólido, que sobreexpresa B7-H3 o que es B7-H3 positivo. En una modalidad, la invención está dirigida al tratamiento del cáncer de pulmón escamoso asociado con la expresión de B7-H3. En otra modalidad, los ADC descritos en la presente descripción se usan para tratar el cáncer de mama triple negativo (TNBC). Las enfermedades y trastornos descritos en la presente descripción pueden tratarse con el ADC anti-B7-H3 de la invención, así como también con composiciones farmacéuticas que comprenden tales ADC anti-B7-H3.

En determinadas modalidades, el cáncer puede caracterizarse por tener una sobreexpresión del EGFR. En una modalidad, los ADC de la invención pueden usarse para tratar el cáncer asociado con una mutación activadora del EGFR. Los ejemplos de tales mutaciones incluyen, pero no se limitan a, una mutación por delección del exón 19, una mutación de sustitución de un solo punto L858R en el exón 21, una mutación de un punto T790M y sus combinaciones.

En determinadas modalidades, los ADC descritos en la presente descripción se administran a un sujeto que los necesita para tratar tipos de tumores sólidos avanzados que probablemente presenten niveles elevados de B7-H3. Los ejemplos de tales tumores incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de ovario, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama triple negativo, carcinoma colorrectal y glioblastoma multiforme.

En determinadas modalidades, la invención incluye un método para inhibir o disminuir el crecimiento de un tumor sólido en un sujeto que tiene un tumor sólido, dicho método que comprende administrar un ADC anti-B7-H3 descrito en la presente descripción, al sujeto que tiene el tumor sólido, de manera que el crecimiento del tumor sólido se inhibe o disminuye. En determinadas modalidades, el tumor sólido es un carcinoma de pulmón de células no pequeñas o un glioblastoma. En modalidades adicionales, el tumor sólido es un tumor sólido que expresa B7-H3. En modalidades adicionales, el tumor sólido es un tumor B7-H3 que se sobreexpresa en tumores sólidos. En determinadas modalidades, los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción se administran a un sujeto que tiene glioblastoma multiforme, solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, radiación y/o temozolomida.

En determinadas modalidades, los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción se administran a un sujeto que tiene cáncer de pulmón de células pequeñas, solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, ABT-199 (venetoclax).

En determinadas modalidades, los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción se administran a un sujeto que tiene cáncer de pulmón de células no pequeñas, solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo,

un taxano. En determinadas modalidades, los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción se administran a un sujeto que tiene cáncer de mama, solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un taxano. En determinadas modalidades, los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción se administran a un sujeto que tiene cáncer de ovario, solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un taxano.

Otras terapias de combinación que se incluyen en la invención son la administración de un ADC anti-B7-H3 con un agente seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD1 (por ejemplo, pembrolizumab), un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab), un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab), un inhibidor de MEK (por ejemplo, trametinib), un inhibidor de ERK, un inhibidor de BRAF (por ejemplo, dabrafenib), osimertinib, erlotinib, gefitinib, sorafenib, un inhibidor de CDK9 (por ejemplo, dinaciclib), un inhibidor de MCL-1, temozolomida, un inhibidor de Bcl-xL, un inhibidor de Bcl-2 (por ejemplo, venetoclax), ibrutinib, un inhibidor de mTOR (por ejemplo, everolimus), un inhibidor de PI3K (por ejemplo, buparlisib), duvelisib, idelalisib, un inhibidor de AKT, un inhibidor de HER2 (por ejemplo, lapatinib), un taxano (por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, nab-paclitaxel), venetoclax, un ADC que comprende una auristatina, un ADC que comprende un PBD (por ejemplo, rovalpituzumab tesirina), un ADC que comprende un maitansinoide (por ejemplo, TDM1), un agonista de TRAIL, un inhibidor del proteasoma (por ejemplo, bortezomib) y un inhibidor de la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT).

Las terapias de combinación incluyen la administración de un ADC de la invención antes, al mismo tiempo o después de la administración de un agente terapéutico adicional, incluidos los descritos anteriormente.

En determinadas modalidades, la invención incluye un método para inhibir o disminuir el crecimiento de un tumor sólido en un sujeto que tiene un tumor sólido que se identificó como un tumor que expresa B7-H3 o que sobreexpresa B7-H3, dicho método comprende administrar un ADC anti-B7-H3 descrito en la presente descripción, al sujeto que tiene el tumor sólido, de manera que el crecimiento del tumor sólido se inhibe o disminuye. Los métodos para identificar tumores que expresan B7-H3 (por ejemplo, tumores que sobreexpresan B7-H3) son conocidos en la técnica e incluyen pruebas y ensayos de validación aprobados por la FDA. Por ejemplo, el ensayo B7-H3 es un sistema de kit inmunohistoquímico cualitativo (IHC) usado para identificar la expresión de B7-H3 en tejidos normales y neoplásicos fijados de forma rutinaria para la evaluación histológica. Además, los ensayos basados en PCR también pueden usarse para identificar tumores que sobreexpresan B7-H3. Los productos de PCR amplificados pueden analizarse posteriormente, por ejemplo, mediante electroforesis en gel mediante el uso de los métodos estándar conocidos en la técnica para determinar el tamaño de los productos de PCR. Tales pruebas pueden usarse para identificar tumores que pueden tratarse con los métodos y composiciones descritos en la presente descripción.

Cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica puede usarse de acuerdo con la invención. Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase Goldspiel y otros, 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; mayo de 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215. Los métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel y otros, (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990). En el documento US20050042664 A1 se proporciona una descripción detallada de varios métodos de terapia génica.

En otro aspecto, esta solicitud presenta un método para tratar (por ejemplo, curar, suprimir, mejorar, retrasar o prevenir el inicio o prevenir la recurrencia o recaída) o prevenir un trastorno asociado a B7-H3, en un sujeto. El método incluye: administrar al sujeto un agente de unión a B7-H3, por ejemplo, un anticuerpo anti-B7-H3 o un fragmento del mismo como se describió en la presente descripción, en una cantidad suficiente para tratar o prevenir el trastorno asociado a B7-H3. El antagonista de B7-H3, por ejemplo, el anticuerpo anti-B7-H3 o un fragmento del mismo, puede administrarse al sujeto, solo o en combinación con otras modalidades terapéuticas como se describió en la presente descripción.

Los anticuerpos o ADC de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden usarse solos o en combinación para tratar tales enfermedades. Debe entenderse que los anticuerpos de la invención o la porción de unión a antígeno de los mismos pueden usarse solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, seleccionándose dicho agente adicional por el experto en la técnica para su propósito previsto. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica como útil para tratar la enfermedad o afección que está siendo tratada por el anticuerpo de la invención. El agente adicional también puede ser un agente que imparta un atributo beneficioso a la composición terapéutica, por ejemplo, un agente que afecte a la viscosidad de la composición.

Debe entenderse además que las combinaciones que se incluirán en esta invención son aquellas combinaciones útiles para el propósito pretendido. Los agentes indicados más abajo son para fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes. Las combinaciones, que son parte de esta invención, pueden ser los anticuerpos de la invención y al menos un agente adicional seleccionado de las listas siguientes. La combinación también puede incluir más de un agente adicional, por ejemplo, dos o tres agentes adicionales si la combinación es tal que la composición formada puede realizar su función deseada.

La terapia de combinación puede incluir uno o más antagonistas de B7-H3, por ejemplo, anticuerpos anti-B7-H3 o fragmentos de los mismos, formulados con y/o administrados conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, una o más citoquinas e inhibidores del factor de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios (por ejemplo, agentes antiinflamatorios sistémicos), agentes antifibróticos, inhibidores metabólicos, inhibidores de enzimas y/o agentes citotóxicos o citostáticos, inhibidores mitóticos, antibióticos antitumorales, agentes inmunomoduladores, vectores para terapia génica, agentes alquilantes, agentes antiangiogénicos, antimetabolitos, agentes que contienen boro, agentes quimioprotectores, hormonas, agentes antihormonales, corticosteroides, agentes terapéuticos fotoactivos, oligonucleótidos, agentes radionúclidos, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de quinasas o radiosensibilizadores, como se describió más en la presente descripción.

En una modalidad particular, las proteínas de unión anti-B7-H3 descritas en la presente descripción se usan en combinación con un agente anticancerígeno o un agente antineoplásico. Los términos "agente anticancerígeno" y "agente antineoplásico" se refieren a fármacos usados para tratar neoplasias, tales como crecimientos cancerosos. La terapia con fármacos puede usarse sola o en combinación con otros tratamientos tales como cirugía o radioterapia. Pueden usarse varias clases de medicamentos en el tratamiento del cáncer, en dependencia de la naturaleza del órgano afectado. Por ejemplo, los estrógenos estimulan habitualmente los cánceres de mama y pueden tratarse con fármacos que inactivan las hormonas sexuales. De manera similar, el cáncer de próstata puede tratarse con medicamentos que inactivan los andrógenos, la hormona sexual masculina. Los agentes anticancerígenos que pueden usarse junto con los ADC anti-B7-H3 de la invención incluyen, entre otros, un anticuerpo anti-PDI (por ejemplo, pembrolizumab), un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab), un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab), un inhibidor de MEK (por ejemplo, trametinib), un inhibidor de ERK, un inhibidor de BRAF (por ejemplo, dabrafenib), osimertinib (AZD9291), erlotinib, gefitinib, sorafenib, un inhibidor de CDK9 (por ejemplo, dinaciclib), un inhibidor de MCL-1, temozolomida, un inhibidor de Bcl-xL, un inhibidor de Bcl-2 (por ejemplo, venetoclax), ibrutinib, un inhibidor de mTOR (por ejemplo, everolimus), un inhibidor de PI3K (por ejemplo, buparlisib), duvelisib, idelalisib, un inhibidor de AKT, un inhibidor de HER2 (por ejemplo, lapatinib), Herceptin, un taxano (por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, nab-paclitaxel), un ADC que comprende una auristatina, un ADC que comprende un PBD (por ejemplo, rovalpituzumab tesirina), un ADC que comprende un maitansinoide (por ejemplo, TDM1), un agonista de TRAIL, un inhibidor del proteasoma (por ejemplo, bortezomib) y un inhibidor de la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT), así como también los siguientes agentes:

| Agente Anticancerígeno | Comentarios | Ejemplos |
|--------------------------------------|--|---|
| Anticuerpos | Anticuerpos que se unen al IGF-1R (receptor del factor de crecimiento tipo 1 similar a la insulina), que se expresa en la superficie celular de la mayoría de los cánceres humanos | A12 (mAb completamente humanizado) 19D12 (mAb completamente humanizado) Cp751-871 (mAb completamente humanizado) H7C10 (mAb humanizado) alphaIR3 (murino) ScFV/FC (murino/quimera humana) EM/164 (murino) |
| | Anticuerpos que se unen al EGFR; Las mutaciones que afectan la expresión o la actividad del EGFR podrían provocar cáncer | Matuzumab (EMD72000) Erbitux® / Cetuximab (Imclone) Vectibix® / Panitumumab (Amgen) mAb 806 |
| | Anticuerpos que se unen a cMET (factor de transición epitelial mesenquimal); miembro de la familia MET del receptor tirosina quinasa) | Nimotuxumab (TheraCIM) AVEO (AV299) (AVEO) AMG102 (Amgen) 5D5 (OA-5d5) (Genentech) H244G11 (Pierre Fabre) |
| | Anticuerpos anti-ErbB3 | Ab # 14 (MM 121-14) Herceptin® (Trastuzumab; Genentech) 1B4C3; 2D1D12 (U3 Pharma AG) NVP-AEW541-A BMS-536,924 (1H-benzimidazol-2-il)-1H-piridin-2-ona) BMS-554,417 Cycloligan TAE226 PQ401 |
| Moléculas Pequeñas Dirigidas a IGF1R | Receptor del factor de crecimiento tipo 1 similar a la insulina que se expresa en la superficie celular de muchos cánceres humanos | |

(continuación)

| | Agente Anticancerígeno | Comentarios | Ejemplos |
|----|---|--|---|
| 5 | Moléculas Pequeñas Dirigidas al EGFR | EGFR; | Iressa® / Gefitinib (AstraZeneca) |
| 10 | | La sobreexpresión o las mutaciones que afectan la expresión o la actividad del EGFR podrían provocar cáncer | CI-1033 (PD 183805) (Pfizer) Lapatinib (GW-572016) (GlaxoSmithKline) Tykerb® / Ditosilato de Lapatinib (Smith Kline Beecham) Tarceva® / Erlotinib HCL (OSI-774) (OSI Pharma) PKI-166 (Novartis) PD-158780 EKB-569 Tirfostina AG 1478 (4-(3-Cloroanilino)-6,7-dimetoxiquinazolina) |
| 20 | Moléculas Pequeñas Dirigidas a los Antimetabolitos de Cmet | cMET (factor de transición epitelial mesenquimal); miembro de la familia MET de receptores tirosina quinasa) | PHA665752 ARQ 197 Flourouracilo (5-FU) Capecitabina / XELODA® (HLR Roche) 5-Trifluorometil-2'-desoxiuridina Metotrexato de sodio (Trexall) (Barr) Raltitrexed / Tomudex® (AstraZeneca) Pemetrexed / Alimta® (Lilly) Tegafur Arabinósido de Citosina (Citarabina, Ara-C) / Tioguanina® (GlaxoSmithKline) |
| 25 | | | 5-azacitidina 6-mercaptopurina (mercaptopurina, 6-MP) Azatioprina / Azasan® (AAIPHARMA LLC) |
| 30 | | | 6-tioguanina (6-TG) / Purinethol® (TEVA) Pentostatina / Nipent® (Hospira Inc.) Fosfato de fludarabina / Fludara® (Bayer Health Care) Cladribina (2-CdA, 2-clorodesoxiadenosina) / Leustatin® (Ortho Biotech) |
| 35 | | | Ribonucleótido Reductasa Inhibidor (RNR) Ciclofosfamida / Cytosan (BMS) Neosar (TEVA) Ifosfamida / Mitoxana® (ASTA Medica) Tiotepa (Bedford, Abraxis, Teva) |
| 40 | Agentes alquilantes | Un agente antineoplásico alquilante es un agente alquilante que une un grupo alquilo al ADN. Dado que las células cancerosas generalmente proliferan sin restricciones más que las células sanas, son más sensibles al daño del ADN, y los agentes alquilantes se usan clínicamente para tratar una variedad de tumores. | BCNU → 1,3-bis(2-cloroetil)-1-nitrosourea CCNU1, -(2-cloroetil)-3-ciclohexil-1-nitrosourea (metil CCNU) Hexametilmelamina (Altretamine1 HMM) / Hexalen® (MGI Pharma Inc.) Busulfán / Myleran (GlaxoSmithKline) Procabazina HCL / Matulane (Sigma Tau Pharmaceuticals, Inc.) Dacarbazina (DTIC) Clorambucil / Leukara® (SmithKline Beecham) |
| 45 | | | Melfalán / Alkeran® (GlaxoSmithKline) Cisplatino (Cisplatino, CDDP)/Platinol (Bristol Myers) |
| 50 | | | |
| 55 | | | |
| 60 | | | |
| 65 | | | |

(continuación)

| | Agente Anticancerígeno | Comentarios | Ejemplos |
|----|---|--|--|
| 5 | | | Carboplatino/Paraplatino (BMS) Oxaliplatino/Eloxitan® (Sanofi-Aventis US) |
| 10 | Inhibidores de la topoisomerasa | Los inhibidores de la topoisomerasa son agentes de quimioterapia diseñados para interferir con la acción de las enzimas topoisomerasas (topoisomerasa I y II), que son enzimas que controlan los cambios en la estructura del ADN catalizando la ruptura y la unión de la cadena principal del fosfodiéster de las cadenas de ADN durante el ciclo celular normal. | Doxorrubicina HCL / Doxil® (Alza) Citrato de daunorrubicina / Daunoxome® (Gilead) Mitoxantrona HCL / Novantrone (EMD Serono) Actinomomicina D Etopósido / Vepesid® (BMS) / Etopophos® (Hospira, Bedford, Teva Parenteral, etc.) Topotecán HCL / Hycamtin® (GlaxoSmithKline) Tenipósido (VM-26) / Vumon® (BMS) Irinotecán HCL (CPT-II) / Camptosar® (Pharmacia y Upjohn) |
| 20 | | | Vincristina / Oncovin® (Lilly) Sulfato de vinblastina / Velban® (descontinuado) (Lilly) Tartrato de vinorelbina / Navelbine® (PierreFabre) Sulfato de vindesina / Eldisine® (Lilly) Paclitaxel / Taxol® (BMS) Docetaxel / Taxotere® (Sanofi Aventis EE. UU.) Nanopartículas de paclitaxel (ABI-007) / Abraxane® (Abraxis BioScience, Inc.) Ixabepilona / IXEMPRA™ (BMS) Mesilato de imatinib / Gleevec (Novartis) Malato de sunitinib / Sutent® (Pfizer) Tosilato de sorafenib / Nexavar® (Bayer) Clorhidrato de nilotinib monohidratado / Tassigna® (Novartis), Osimertinib, Cobimetinib, Trametinib, Dabrafenib, Dinaciclib L-asparaginasa / Elspar® (Merck & Co.) |
| 25 | Agentes dirigidos a los microtúbulos | Los microtúbulos son uno de los componentes del citoesqueleto. Tienen un diámetro de ~24 nm y una longitud que varía desde varios micrómetros hasta posiblemente milímetros en los axones de las células nerviosas. Los microtúbulos sirven como componentes estructurales dentro de las células y están involucrados en muchos procesos celulares que incluyen mitosis, citocinesis y transporte vesicular. | |
| 30 | | | |
| 35 | | | |
| 40 | Inhibidores de quinasas | Las quinasas son enzimas que catalizan la transferencia de grupos fosfato desde moléculas donantes de fosfato de alta energía a sustratos específicos, y se utilizan para transmitir señales y regular procesos complejos en las células. | |
| 45 | | | |
| 50 | | | |
| 55 | Inhibidores de la síntesis de proteínas Agentes inmunoterapéuticos | Induce la apoptosis celular Inducen a los pacientes con cáncer a exhibir una respuesta inmune | Interferón alfa Inhibidor de la Angiogénesis / Avastin® (Genentech) IL-2 → Interleucina 2 (Aldegleucina) / Proleucina® (Quirón) IL-12 → Interleucina 12 |
| 60 | | | |
| 65 | | | |

| (continuación) | | | |
|----------------|------------------------|---|---|
| | Agente Anticancerígeno | Comentarios | Ejemplos |
| 5 | | Anticuerpos/moléculas pequeñas moduladoras de puntos de control del sistema inmune | Terapias anti-CTLA-4 y PR-1 Yervoy® (ipilimumab; Bristol-Myers Squibb) Opdivo® (nivolumab; Bristol-Myers Squibb) |
| 10 | Hormonas | Las terapias hormonales asociadas con la menopausia y el envejecimiento buscan aumentar la cantidad de determinadas hormonas en su cuerpo para compensar las disminuciones hormonales relacionadas con la edad o la enfermedad. La terapia hormonal como tratamiento del cáncer reduce el nivel de hormonas específicas o altera la capacidad del cáncer de usar estas hormonas para crecer y diseminarse. | Keytrada® (pembrolizumab; Merck) |
| 15 | | | Citrato de toremifeno / Fareston® (GTX, Inc.) Fulvestrant / Faslodex® (AstraZeneca) |
| 20 | | | Raloxifeno HCL / Evista® (Lilly) Anastrozol / Arimidex® (AstraZeneca) |
| 25 | | | Letrozol / Femara® (Novartis) Fadrozol (CGS 16949A) Exemestano / Aromasin® (Pharmacia y Upjohn) |
| 30 | | | Acetato de leuprolida / Eligard® (QTL EE. UU.) Lupron® (TAP Pharm) |
| 35 | | | Acetato de goserelina / Zoladex® (AstraZeneca) Pamoato de triptorelina / Trelstar® (Watson Labs) |
| 40 | | | Buserelina / Suprefact® (Sanofi Aventis) Nafarelina / Synarel® (Pfizer) |
| 45 | | | Cetrorelix / Cetrotide® (EMD Serono) Bicalutamida / Casodex® (AstraZeneca) |
| 50 | | | Nilutamida / Nilandron® (Aventis Pharm.) Acetato de megestrol / Megace® (BMS) |
| 55 | | | Glucocorticoides |
| 60 | Inhibidores aromáticos | Incluye imidazoles | Ketoconazol |
| 65 | Inhibidores de mTOR | la vía de señalización mTOR se descubrió originalmente durante los estudios del agente inmunosupresor rapamicina. Esta vía altamente conservada regula la proliferación y el metabolismo celular en respuesta a factores ambientales, vinculando la señalización del receptor del factor de crecimiento celular a través de la fosfoinositido-3-quinasa (PI-3K) al crecimiento, la proliferación y la angiogénesis celular. | Sirolimus (rapamicina) / Rapamune® (Wyeth) Temsilimus (CCI-779) / Torisel® (Wyeth) Deforolimus (AP23573) / (Ariad Pharm.) Everolimus (RAD001) / Certican® (Novartis) |

Además de los agentes anticancerígenos anteriores, los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción pueden administrarse en combinación con los agentes descritos en la presente descripción.

En modalidades particulares, los ADC anti-B7-H3 pueden administrarse solos o con otro agente anticancerígeno que actúe junto con el anticuerpo o sinérgicamente con él para tratar la enfermedad asociada con la actividad B7-H3. Tales agentes anticancerígenos incluyen, por ejemplo, agentes bien conocidos en la técnica (por ejemplo, citotoxinas, agentes quimioterapéuticos, moléculas pequeñas y radiación). Los ejemplos de agentes anticancerígenos incluyen, pero no se limitan a, Panorex (Glaxo-Wellcome), Rituxan (IDEC/Genentech/Hoffman la Roche), Mylotarg (Wyeth), Campath (Millennium), Zevalin (IDEC y Schering AG), Bexxar (Corixa/GSK), Erbitux (Imclone/BMS), Avastin (Genentech) y Herceptin (Genentech/Hoffman la Roche). Otros agentes anticancerígenos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en la Patente de Estados Unidos Núm. 7,598,028 y la Solicitud Internacional Núm. WO2008/100624. Pueden administrarse uno o más agentes anticancerígenos simultáneamente o antes o después de la administración de un anticuerpo o parte de la invención que se une al antígeno.

En modalidades particulares de la invención, los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción pueden usarse en una terapia de combinación con un agente apoptótico, tal como un inhibidor de Bcl-xL o un inhibidor de Bcl-2 (linfoma 2 de células B) (por ejemplo, ABT-199 (venetoclax)) para tratar el cáncer, tal como la leucemia, en un sujeto. En una modalidad, los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción pueden usarse en una terapia de combinación con un inhibidor de Bcl-xL para tratar el cáncer. En una modalidad, los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción pueden usarse en una terapia de combinación con venetoclax para tratar el cáncer.

En modalidades particulares de la invención, los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción pueden usarse en una terapia de combinación con un inhibidor de NAMPT (véanse los ejemplos de inhibidores en el documento US 2013/0303509; AbbVie, Inc.) para tratar a un sujeto que lo necesite. NAMPT (también conocido como factor potenciador de colonias de células B (PBEF) y visfatina) es una enzima que cataliza la fosforribosilación de la nicotinamida y es la enzima limitante de la velocidad en una de las dos vías que recuperan NAD. En una modalidad de la invención, los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción se administran en combinación con un inhibidor de NAMPT para el tratamiento del cáncer en un sujeto.

En modalidades particulares de la invención, los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción pueden usarse en una terapia de combinación con SN-38, que es el metabolito activo del inhibidor de la topoisomerasa irinotecán.

En otras modalidades de la invención, los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción pueden usarse en una terapia de combinación con un inhibidor de PARP (poli ADP ribosa polimerasa), por ejemplo, veliparib, para tratar el cáncer, incluido el de mama, ovario y el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Otros ejemplos de agentes terapéuticos adicionales que pueden administrarse conjuntamente y/o formularse con los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción, incluyen, pero no se limitan a, uno o más de: esteroides inhalados; beta-agonistas, por ejemplo, beta-agonistas de acción corta o de acción prolongada; antagonistas de leucotrienos o receptores de leucotrienos; combinación de fármacos tal como ADVAIR; inhibidores de IgE, por ejemplo, anticuerpos anti-IgE (por ejemplo, XOLAIR®, omalizumab); inhibidores de fosfodiesterasa (por ejemplo, inhibidores de PDE4); xantinas; fármacos anticolinérgicos; agentes estabilizadores de mastocitos tales como cromoglicato; inhibidores de IL-4; inhibidores de IL-5; inhibidores de eotaxina/CCR3; antagonistas de la histamina o sus receptores, incluidos H1, H2, H3 y H4, y antagonistas de la prostaglandina D, o sus receptores (DP1 y CRTH2). Tales combinaciones pueden usarse para tratar, por ejemplo, el asma y otros trastornos respiratorios. Otros ejemplos de agentes terapéuticos adicionales que pueden administrarse conjuntamente y/o formularse con los ADC anti-B7-H3 descritos en la presente descripción, incluyen, pero no se limitan a, uno o más de un anticuerpo anti-PD1 (por ejemplo, pembrolizumab), un anticuerpo anti-PD-L1 (por ejemplo, atezolizumab), un anticuerpo anti-CTLA-4 (por ejemplo, ipilimumab), un inhibidor de MEK (por ejemplo, trametinib), un inhibidor de ERK, un inhibidor de BRAF (por ejemplo, dabrafenib), osimertinib (AZD9291), erlotinib, gefitinib, sorafenib, un inhibidor de CDK9 (por ejemplo, dinaciclib), un inhibidor de MCL-1, temozolomida, un inhibidor de Bcl-xL, un inhibidor de Bcl-2 (por ejemplo, venetoclax), ibrutinib, un inhibidor de mTOR (por ejemplo, everolimus), un inhibidor de PI3K (por ejemplo, buparlisib), duvelisib, idelalisib, un inhibidor de AKT, un inhibidor de HER2 (por ejemplo, lapatinib), Herceptin, un taxano (por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, nab-paclitaxel), un ADC que comprende una auristatina, un ADC que comprende un PBD (por ejemplo, rovalpituzumab tesirina), un ADC que comprende un maitansinoide (por ejemplo, TDM1), un agonista de TRAIL, un inhibidor del proteasoma (por ejemplo, bortezomib) y un inhibidor de la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT). Los ejemplos adicionales de agentes terapéuticos que pueden administrarse conjuntamente y/o formularse con uno o más anticuerpos anti-B7-H3 o fragmentos de los mismos incluyen uno o más de: antagonistas del TNF (por ejemplo, un fragmento soluble de un receptor de TNF, por ejemplo, p55 o receptor de TNF humano p75 o derivados del mismo, por ejemplo, TNFR-IgG de 75 kD (proteína de fusión de receptor de TNF-IgG de 75 kD, ENBREX)); antagonistas de la enzima TNF, por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de TNF (TACE); antagonistas de los receptores muscarínicos; antagonistas del TGF-beta; interferón gamma; perfenidona; agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, leflunomida o un sirolimus (rapamicina) o un análogo de los mismos, por ejemplo, CCI-779; inhibidores de COX2 y cPLA2; NSAID; inmunomoduladores; inhibidores de p38, inhibidores de TPL-2, MK-2 y NFkB, entre otros.

Otras combinaciones preferidas son fármacos antiinflamatorios supresores de citocinas (CSAID); anticuerpos o antagonistas de otras citocinas o factores de crecimiento humanos, por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-21, IL-31, interferones, EMAP-II, GM-CSF, FGF, EGF, PDGF y edotelina-1, así como también los receptores de estas citocinas y factores de crecimiento. Los anticuerpos de la invención, o porciones de unión a antígeno de los mismos, pueden combinarse con anticuerpos contra moléculas de la superficie celular tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD30, CD40, CD45, CD69, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD90, CTLA, CTLA-4, PD-1 o sus ligandos, incluido CD154 (gp39 o CD40L).

Las combinaciones preferidas de agentes terapéuticos pueden interferir en diferentes puntos de la cascada inflamatoria; los ejemplos preferidos incluyen antagonistas de TNF tal como anticuerpos de TNF quiméricos, humanizados o humanos, adalimumab, (HUMIRA; D2E7; Solicitud PCT Núm. WO 97/29131 y Patente de los Estados Unidos Núm. 6.090.382), CA2 (Remicade TM), CDP 571 y receptores solubles de TNF p55 o p75, derivados, de los mismos (p75TNFR1gG (EnbrelTM) o p55TNFR1gG (Lenercept), y también inhibidores de la enzima convertidora de TNF (TACE); de manera similar, los inhibidores de IL-1 (inhibidores de la enzima convertidora de interleucina-1, IL-1RA, etc.) pueden ser efectivos por la misma razón. Otras combinaciones preferidas incluyen Interleucina 4.

[01] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una persona experta en la técnica puede determinar una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o porción de anticuerpo y puede variar de acuerdo con los factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o la porción de anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva es también aquella en la que los efectos terapéuticamente beneficiosos superan los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo, o porción de anticuerpo. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en las dosis y durante los períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, dado que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, puede administrarse un solo bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación, como se usa en la presente descripción, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que desea lograrse, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de preparar tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Un intervalo ilustrativo, no limitativo, para una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un ADC es 0,1-20 mg/kg, con mayor preferencia 1-10 mg/kg. En una modalidad, la dosis del ADC descrito en la presente descripción es de 1 a 6 mg/kg, incluidas las dosis individuales enumeradas en el mismo, por ejemplo, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg y 6 mg/kg. En otra modalidad, la dosis del ADC descrito en la presente descripción es de 1 a 200 µg/kg, incluidas las dosis individuales enumeradas en el mismo, por ejemplo, 1 µg/kg, 2 µg/kg, 3 µg/kg, 4 µg/kg, 5 µg/kg, 10 µg/kg, 20 µg/kg, 30 µg/kg, 40 µg/kg, 50 µg/kg, 60 µg/kg, 80 µg/kg, 100 µg/kg, 120 µg/kg, 140 µg/kg, 160 µg/kg, 180 µg/kg y 200 µg/kg. Cabe señalar que los valores de dosis pueden variar con el tipo y la gravedad de la afección que se va a aliviar. Debe entenderse además que, para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación establecidos en la presente descripción son únicamente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

En una modalidad, un ADC anti-B7-H3 se administra a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, a una dosis de 0,1 a 30 mg/kg. En otra modalidad, el anticuerpo anti-B7-H3 se administra a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, como un ADC a una dosis de 1 a 15 mg/kg. En otra modalidad, el anticuerpo anti-B7-H3 se administra a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, como un ADC a una dosis de 1 a 10 mg/kg. En otra modalidad, el anticuerpo anti-B7-H3 se administra a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, como un ADC a una dosis de 2 a 3. En otra modalidad, el anticuerpo anti-B7-H3 se administra a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, como un ADC a una dosis de 1 a 4 mg/kg.

En una modalidad, un ADC anti-B7-H3 descrito en la presente descripción se administra a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, como ADC a una dosis de 1 a 200 µg/kg. En otra modalidad, el anticuerpo anti-B7-H3 se administra a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, como un ADC a una dosis de 5 a 150 µg/kg. En otra modalidad, el anticuerpo anti-B7-H3 se administra a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, como un ADC a una dosis de 5 a 100 µg/kg. En otra modalidad, el anticuerpo anti-B7-H3 se administra a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, como un ADC a una dosis de 5 a 90 µg/kg. En otra modalidad, el anticuerpo anti-B7-H3 se administra a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, como un ADC a una dosis de 5 a 80 µg/kg. En otra modalidad, el anticuerpo anti-B7-H3 se administra a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, como un ADC a una dosis de 5 a 70 µg/kg. En otra modalidad, el anticuerpo anti-B7-H3 se administra a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, como un ADC a una dosis de 5 a 60 mg/kg. En otra modalidad, el anticuerpo anti-B7-H3 se administra a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto que tiene cáncer, como un ADC a una dosis de 10 a 80 µg/kg.

Las dosis descritas anteriormente pueden ser útiles para la administración de anti-B7-H3 descrito en la presente descripción.

Dada su capacidad para unirse a la B7-H3 humana, los anticuerpos anti-B7-H3 humano, o porciones de los mismos (así como también sus ADC) pueden usarse para detectar B7-H3 humano (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), mediante el uso de un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica tisular. En un aspecto, la invención proporciona un método para detectar la B7-H3 humana en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo o porción de anticuerpo y detectar el anticuerpo (o porción de anticuerpo) unido a la B7-H3 humana o el anticuerpo no unido (o porción de anticuerpo), para así detectar la B7-H3 humana en la muestra biológica. El anticuerpo se marca directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del anticuerpo unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina, fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁷⁷Lu, ¹⁶⁶Ho, o ¹⁵³Sm.

Como alternativa al marcaje del anticuerpo, la B7-H3 humana puede ensayarse en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competición mediante el uso de los patrones de rhB7-H3 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-B7-H3 humano no marcado. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones de rhB7-H3 marcados y el anticuerpo anti-B7-H3 humano se combinan y se determina la cantidad de patrón de rhB7-H3 marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de la B7-H3 humana en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de patrón de rhB7-H3 marcado unido al anticuerpo anti-B7-H3. De manera similar, la B7-H3 humana también puede ensayarse en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competición mediante el uso de patrones de rhB7-H3 marcados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-B7-H3 humano no marcado.

VI. Composiciones Farmacéuticas

La invención también proporciona las composiciones farmacéuticas que comprenden un ADC de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los ADC de la invención se usan en, pero no se limitan a, diagnosticar, detectar o controlar un trastorno, para prevenir, tratar, controlar o mejorar un trastorno o uno o más síntomas del mismo, y/o en investigación. En otra modalidad, la composición farmacéutica comprende uno o más ADC de la invención y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos de los ADC de la invención para tratar un trastorno en el que la actividad de B7-H3 es perjudicial. Preferentemente, los agentes profilácticos o terapéuticos que se sabe que son útiles para la prevención, el tratamiento, la gestión o la mejora de un trastorno o uno o más síntomas del mismo, o que se han usado o se están usando actualmente. De acuerdo con estas modalidades, la composición puede comprender además un portador, diluyente o excipiente.

Los ADC de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente descripción, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares que sean fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como también sus combinaciones. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los portadores farmacéuticamente

aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que mejoran la vida útil o la eficacia del ADC.

Se conocen varios sistemas de liberación y pueden usarse para administrar el ADC de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector, etc. Los métodos para administrar un agente profiláctico o terapéutico de la invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), administración epidural, administración intratumoral y administración mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral). Además, puede emplearse la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y una formulación con un agente aerosol. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. Núm. 6,019,968, 5,985, 320, 5,985,309, 5,934, 272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290, 540, y 4,880,078; y las Solicitudes PCT Núm. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, y WO 99/66903. En una modalidad, se administra una composición de la invención mediante el uso de la tecnología de administración de fármacos pulmonares Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.). En una modalidad específica, los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención se administran por vía intramuscular, intravenosa, intratumoral, oral, intranasal, pulmonar o subcutánea. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de recubrimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En una modalidad específica, puede ser deseable administrar los agentes profilácticos o terapéuticos de la invención localmente en el área que necesita tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local, por inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso o no poroso, que incluye membranas y matrices, tales como membranas sialásticas, polímeros, matrices fibrosas (por ejemplo, Tissuel®) o matrices de colágeno. En una modalidad, una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos antagonistas de la invención se administra localmente al área afectada a un sujeto para prevenir, tratar, manejar y/o mejorar un trastorno o síntoma del mismo. En otra modalidad, una cantidad efectiva de uno o más anticuerpos de la invención se administra localmente al área afectada en combinación con una cantidad efectiva de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos) distintos de un anticuerpo de la invención de un sujeto para prevenir, tratar, manejar y/o mejorar un trastorno o uno o más de sus síntomas.

En otra modalidad, el agente profiláctico o terapéutico de la invención puede administrarse en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. En una modalidad, puede usarse una bomba para lograr una liberación controlada o sostenida (véase Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald y otros, 1980, Surgery 88:507; Saudek y otros, 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra modalidad, pueden usarse materiales poliméricos para lograr la liberación controlada o sostenida de las terapias de la invención (véase, por ejemplo, Medical Applications of Controlled Release, Langer y Wise (ed.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (ed.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; véase también Levy y otros, 1985, Science 228:190; During y otros, 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard y otros, 1989, J. Neurosurg. 7 1:105); Patente de EE. UU. Núm. 5,679,377; Patente de EE. UU. Núm. 5, 916,597; Patente de EE. UU. Núm. 5,912,015; Patente de EE. UU. Núm. 5,989,463; Patente de EE. UU. Núm. 5,128,326; Solicitud PCT Núm. WO 99/15154; y Solicitud PCT Núm. WO 99/20253. Los ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli(metacrilato de 2-hidroxiethyl), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poli(acrilamida), poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólidos) (PLGA) y poliortoésteres. En una modalidad preferida, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable al almacenamiento, estéril y biodegradable. En otra modalidad más, puede colocarse un sistema de liberación controlada o sostenida cerca de la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Los sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (1990, Science 249: 1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la técnica para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más agentes terapéuticos de la invención. Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Núm. 4,526,938, la Solicitud PCT WO 91/05548, la Solicitud PCT WO 96/20698, Ning y otros, 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song y otros, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek y otros, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, y Lam y otros, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759-760.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con la vía de administración

prevista. Los ejemplos de las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, intranasal (por ejemplo, inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosal y rectal. En una modalidad específica, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral, intranasal o tópica a seres humanos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como la lignocaína para aliviar el dolor en el lugar de la inyección.

Si el método de la invención comprende la administración intranasal de una composición, la composición puede formularse en forma de aerosol, pulverización, neblina o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos para su uso de acuerdo con la invención pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación en aerosol en forma de aerosol a partir de paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono) u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Pueden formularse cápsulas y cartuchos (compuestos de, por ejemplo, gelatina) para uso en un inhalador o insuflador que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Si el método de la invención comprende la administración oral, las composiciones pueden formularse por vía oral en forma de comprimidos, cápsulas, sellos, cápsulas de gel, soluciones, suspensiones y similares. Los comprimidos o cápsulas pueden prepararse por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz previamente gelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); desintegrantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato de almidón de sodio); o agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, pero no se limitan a, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado. Las preparaciones para administración oral pueden formularse de forma adecuada para liberación lenta, liberación controlada o liberación sostenida de un agente o agentes profilácticos o terapéuticos.

El método de la invención puede comprender la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, de una composición formulada con un agente aerosolizante. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. Núm. 6,019, 968, 5,985, 320, 5, 985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540, and 4,880,078; y las Solicitudes PCT Núm. WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En una modalidad específica, una composición de la invención se administra mediante el uso de la tecnología de administración de fármacos pulmonares Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

El método de la invención puede comprender la administración de una composición formulada para administración parenteral mediante inyección (por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua). Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis) con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para reconstituirlo con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos) antes de su uso.

Los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente la administración de composiciones formuladas como preparaciones de depósito. Estas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación (por ejemplo, subcutánea o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las composiciones pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles (por ejemplo, como una sal poco soluble).

Los métodos de la invención abarcan la administración de composiciones formuladas como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con aniones tales como las derivadas de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaina, etc.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones se suministran por separado o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando el modo de administración es infusión, la composición puede dispensarse con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estéril con calidad farmacéutica. Cuando el modo de administración es por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes puedan mezclarse antes de la administración.

En particular, la invención también prevé que uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o composiciones farmacéuticas de la invención, se envasen en un recipiente herméticamente cerrado, tal como una ampolla o bolsita que indique la cantidad del agente. En una modalidad, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención se suministran como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado y pueden reconstituirse (por ejemplo, con agua o solución salina) para la concentración apropiada para la administración a un sujeto. Preferentemente, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o las composiciones farmacéuticas de la invención se suministran como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente herméticamente cerrado a una dosis unitaria de al menos 5 mg, al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 75 mg o al menos 100 mg. Los agentes profilácticos o terapéuticos liofilizados o las composiciones farmacéuticas de la invención deben almacenarse entre 2 °C y 8 °C en su recipiente original y los agentes profilácticos o terapéuticos, o las composiciones farmacéuticas de la invención deben administrarse dentro de 1 semana, dentro de los 5 días, dentro de las 72 horas, dentro de 48 horas, dentro de 24 horas, dentro de 12 horas, dentro de 6 horas, dentro de 5 horas, dentro de 3 horas o dentro de la hora siguiente a la reconstitución. En una modalidad alternativa, uno o más de los agentes profilácticos o terapéuticos o las composiciones farmacéuticas de la invención se suministran en forma líquida en un recipiente cerrado herméticamente que indica la cantidad y concentración del agente. Preferentemente, la forma líquida de la composición administrada se suministra en un recipiente herméticamente cerrado al menos 0,25 mg/ml, al menos 0,5 mg/ml, al menos 1 mg/ml, al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg, al menos 25 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml. La forma líquida debe almacenarse entre 2 °C y 8 °C en su recipiente original.

Los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención pueden incorporarse en una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral. Preferentemente, el anticuerpo o las porciones de anticuerpo se prepararán como una solución inyectable que contiene 0,1-250 mg/ml de anticuerpo. La solución inyectable puede estar compuesta de una forma de dosificación líquida o liofilizada en un vial de pedernal o ámbar, ampolla o jeringa previamente cargada. El tampón puede ser L-histidina (1-50 mM), óptimamente 5-10 mM, a pH 5,0 a 7,0 (óptimo pH 6,0). Otros tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, succinato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio o fosfato de potasio. Puede usarse cloruro de sodio para modificar la toxicidad de la solución a una concentración de 0-300 mM (óptimamente 150 mM para una forma de dosificación líquida). Pueden incluirse crioprotectores para una forma de dosificación liofilizada, principalmente sacarosa al 0-10 % (óptimamente, 0,5-1,0 %). Otros crioprotectores adecuados incluyen trehalosa y lactosa. Pueden incluirse agentes de carga para una forma de dosificación liofilizada, principalmente manitol al 1-10 % (óptimamente, 2-4 %). Los estabilizadores se pueden usar en formas de dosificación tanto líquidas como liofilizadas, principalmente L-metionina 1-50 mM (óptimamente 5-10 mM). Otros agentes de carga adecuados incluyen glicina, arginina, que pueden incluirse como 0-0,05 % de polisorbato-80 (óptimamente 0,005-0,01 %). Los tensioactivos adicionales incluyen, pero no se limitan a, polisorbato 20 y tensioactivos BRIJ. La composición farmacéutica que comprende los anticuerpos y las porciones de anticuerpos de la invención preparada como una solución inyectable para administración parenteral, puede comprender además un agente útil como adyuvante, tal como los que se usan para aumentar la absorción o dispersión de una proteína terapéutica (por ejemplo, anticuerpo). Un adyuvante particularmente útil es la hialuronidasa, tal como Hylenex® (hialuronidasa humana recombinante). La adición de hialuronidasa en la solución inyectable mejora la biodisponibilidad humana después de la administración parenteral, particularmente la administración subcutánea. También permite mayores volúmenes en el lugar de la inyección (es decir, más de 1 ml) con menos dolor e incomodidad, y una incidencia mínima de reacciones en el lugar de la inyección. (véanse los documentos WO2004078140, US2006104968 incorporados en la presente descripción como referencia).

Las composiciones de esta invención pueden presentarse en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, tabletas, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y aplicación terapéutica previstos. Las composiciones típicas preferidas están en forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. El modo de administración preferido es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En una modalidad preferida, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otra modalidad preferida, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. Pueden prepararse soluciones inyectables

estériles mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, 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 liofilizados estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y el secado por pulverización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada filtrada del mismo. La fluidez adecuada de una solución puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La absorción prolongada de composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo, en la composición, un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los ADC de la invención pueden administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo de administración preferido es inyección subcutánea, inyección intravenosa o infusión. Como apreciará el experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración variarán en dependencia de los resultados deseados. En determinadas modalidades, el compuesto activo puede prepararse con un portador que protegerá al compuesto contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etilvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En determinadas modalidades, un ADC de la invención puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también pueden encerrarse en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimirse en comprimidos o incorporarse directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, grageas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un compuesto de la invención mediante una administración distinta a la parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o administrar conjuntamente el compuesto con, un material para prevenir su inactivación.

En otras modalidades, un ADC de la invención puede conjugarse con una especie basada en polímero de manera que dicha especie basada en polímero pueda conferir un tamaño suficiente a dicho anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención de manera que dicho anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención se beneficie del efecto de retención y permeabilidad mejorada (efecto EPR) (véase también la Solicitud PCT Núm. WO2006/042146A2 y las Publicaciones de EE. UU. Núm. 2004/0028687A1, 2009/0285757A1 y 2011/0217363A1, y la Patente de EE. UU. Núm. 7,695,719.

También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones. En determinadas modalidades, un ADC de la invención se formula y/o se administra conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para tratar trastornos en los que la actividad de B7-H3 es perjudicial. Por ejemplo, un ADC de la invención puede formularse y/o administrarse conjuntamente con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (por ejemplo, anticuerpos que se unen a citocinas o que se unen a moléculas de la superficie celular). Además, pueden usarse uno o más anticuerpos de la invención en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosis más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En determinadas modalidades, un ADC para B7-H3 o un fragmento del mismo está unido a un vehículo que prolonga la vida media conocida en la técnica. Tales vehículos incluyen, pero no se limitan a, el dominio Fc, polietilenglicol y dextrano. Tales vehículos se describen, por ejemplo, en la Solicitud de EE. UU. Núm. de Serie 09/428,082 y en la Solicitud PCT publicada Núm. WO 99/25044.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de Inhibidores Ilustrativos de Bcl-xL

Este ejemplo proporciona métodos sintéticos para compuestos ilustrativos inhibidores de Bcl-xL. Los inhibidores y sintones de Bcl-xL se nombraron mediante el uso de la versión ACD/Name 2012 (Compilación 56084, 5 de abril de 2012, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario), versión ACD/Name 2014 (Compilación 66687, 25 de octubre de 2013, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario), ChemDraw® Ver. 9.0.7 (CambridgeSoft, Cambridge, MA), ChemDraw® Ultra Ver. 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA) o ChemDraw® Professional Ver. 15.0.0.106. El inhibidor de Bcl-xL y los intermediarios sintéticos se nombraron con la versión ACD/Name 2012 (Compilación 56084, 5 de abril de 2012, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Ontario), versión ACD/Name 2014 (Compilación 66687, 25 de octubre de 2013, Advanced Chemistry Development Inc.,

Toronto, Ontario), ChemDraw® Ver. 9.0.7 (CambridgeSoft, Cambridge, MA), ChemDraw® Ultra Ver. 12.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA) o ChemDraw® Professional Ver. 15.0.0.106.

1.1.1 Ácido 3-bromo-5,7-dimetiladamantanocarboxílico

En un matraz de fondo redondo de 50 ml a 0 °C, se añadió bromo (16 ml). Se añadió hierro en polvo (7 g) y la reacción se agitó a 0 °C durante 30 minutos. Se añadió ácido 3,5-dimetiladamantano-1-carboxílico (12 g). La mezcla se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 3 días. Se vertió una mezcla de hielo y HCl concentrado en la mezcla de reacción. La suspensión resultante se trató dos veces con Na₂SO₃ (50 g en 200 ml de agua) y se extrajo tres veces con diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con HCl acuoso 1 N, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para dar el compuesto del título.

1.1.2 3-bromo-5,7-dimetiladamantanometanol

A una solución del Ejemplo 1.1.1 (15,4 g) en tetrahidrofurano (200 ml) se le añadió BH₃ (1 M en tetrahidrofurano, 150 ml) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después, la mezcla de reacción se inactivó cuidadosamente añadiendo metanol gota a gota. Después, la mezcla se concentró al vacío y el residuo se equilibró entre acetato de etilo (500 ml) y HCl acuoso 2 N (100 ml). La capa acuosa se extrajo dos veces más con acetato de etilo y los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se filtraron. La evaporación del solvente proporcionó el compuesto del título.

1.1.3 1-((3-bromo-5,7-dimetiltríciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)metil)-1H-pirazol

A una solución del Ejemplo 1.1.2 (8,0 g) en tolueno (60 ml) se le añadió 1H-pirazol (1,55 g) y cianometiltributilfosforano (2,0 g) y la mezcla se agitó a 90 °C durante la noche. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (heptano: acetato de etilo 10:1) para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 324,2 (M+H)⁺.

1.1.4 2-((3,5-dimetil-7-(1H-pirazol-1-ilmetil)tríciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)oxi)etanol

A una solución del Ejemplo 1.1.3 (4,0 g) en etano-1,2-diol (12 ml) se le añadió trietilamina (3 ml). La mezcla se agitó a 150 °C en condiciones de microondas (Biotage Initiator) durante 45 minutos. La mezcla se vertió en agua (100 ml) y se extrajo tres veces con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se filtraron. La evaporación del solvente dio un residuo que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con acetato de etilo al 20 % en heptano, seguido de metanol al 5 % en diclorometano, para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 305,2 (M+H)⁺.

1.1.5 2-((3,5-dimetil-7-((5-metil-1H-pirazol-1-il)metil)tríciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)oxi)etanol

A una solución fría (-78 °C) del Ejemplo 1.1.4 (6,05 g) en tetrahidrofurano (100 ml) se le añadió n-BuLi (40 ml, 2,5 M en hexano) y la mezcla se agitó a -78 °C durante 1,5 horas. Se añadió yodometano (10 ml) a través de una jeringa y la mezcla se agitó a -78 °C durante 3 horas. Después, la mezcla de reacción se inactivó con NH₄Cl acuoso y se extrajo dos veces con acetato de etilo y los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera. Después de secar sobre sulfato de sodio, la solución se filtró y concentró, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice, mediante la elución con metanol al 5 % en diclorometano, para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 319,5 (M + H)⁺.

1.1.6 1-((3,5-dimetil-7-[2-(hidroxi)etoxi]tríciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)metil)-4-yodo-5-metil-1H-pirazol

A una solución del Ejemplo 1.1.5 (3,5 g) en N,N-dimetilformamida (30 ml) se le añadió N-yodosuccinimida (3,2 g) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (600 ml) y se lavó con NaHSO₃ acuoso, agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con acetato de etilo al 20 % en diclorometano, para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 445,3 (M+H)⁺.

1.1.9 Ácido 6-fluoro-3-bromopicolínico

Se añadió una suspensión de ácido 6-amino-3-bromopicolínico (25 g) en 400 ml de diclorometano/cloroformo 1:1 a tetrafluoroborato de nitrosonio (18,2 g) en diclorometano (100 ml) a 5 °C durante 1 hora. La mezcla resultante se agitó durante otros 30 minutos, luego se calentó a 35 °C y se agitó durante la noche. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y luego se ajustó a pH 4 con una solución acuosa de NaH₂PO₄. La solución resultante se extrajo tres veces con diclorometano y los extractos combinados se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para proporcionar el compuesto del título.

1.1.10 3-bromo-6-fluoropicolinato de terc-butilo

Se añadió cloruro de para-toluenosulfonilo (27,6 g) a una solución del Ejemplo 1.1.9 (14,5 g) y piridina (26,7 ml) en diclorometano (100 ml) y terc-butanol (80 ml) a 0 °C. La reacción se agitó durante 15 minutos y luego se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La solución se concentró y se distribuyó entre acetato de etilo y una solución acuosa de Na₂CO₃. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo. Las

5 capas orgánicas se combinaron, se aclararon con una solución acuosa de Na₂CO₃ y salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para proporcionar el compuesto del título.

1.1.11 2-(5-bromo-6-(terc-butoxicarbonil)piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-8-carboxilato de metilo

10 A una solución de hidrocloreto de metil 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-8-carboxilato (12,37 g) y del Ejemplo 1.1.10 (15 g) en dimetilsulfóxido (100 ml) se le añadió N,N-diisopropiletilamina (12 ml) y la mezcla se agitó a 50 °C durante 24 horas. Después, la mezcla se diluyó con acetato de etilo (500 ml) y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante

15 cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con acetato de etilo al 20 % en hexano, para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 448,4 (M + H)⁺.

1.2.1 2-(6-(terc-butoxicarbonil)-5-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-8-carboxilato de metilo

20 A una solución del Ejemplo 1.1.11 (2,25 g) y [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaldio(II) (205 mg) en acetonitrilo (30 ml) se le añadió trietilamina (3 ml) y pinacolborano (2 ml) y la mezcla se agitó a reflujo durante 3 horas. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. La purificación del residuo mediante cromatografía

25 en gel de sílice, mediante la elución con acetato de etilo al 20 % en hexano, proporcionó el compuesto del título.

1.2.2 2-(6-(terc-butoxicarbonil)-5-(1-((3-(2-hidroxietoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-8-carboxilato de metilo

30 A una solución del Ejemplo 1.2.1 (2,25 g) en tetrahidrofurano (30 ml) y agua (10 ml) se le añadió el Ejemplo 1.1.6 (2,0 g), 1,3,5,7-tetrametil-6-fenil-2,4,8-trioxa-6-fosfaadamantano (329 mg), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0) (206 mg) y fosfato de potasio tribásico (4,78 g). La mezcla se calentó a reflujo durante la noche, se enfrió y se diluyó con acetato de etilo (500 ml). La mezcla resultante se lavó con agua y salmuera y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida, mediante la

35 elución con acetato de etilo al 20 % en heptanos seguido de metanol al 5 % en diclorometano, para proporcionar el compuesto del título.

1.2.3 2-(6-(terc-butoxicarbonil)-5-(1-((3,5-dimetil-7-(2-((metilsulfonil)oxi)etoxi)adamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-8-carboxilato de metilo

40 A una solución fría del Ejemplo 1.2.2 (3,32 g) en diclorometano (100 ml) en un baño de hielo se le añadió secuencialmente trietilamina (3 ml) y cloruro de metanosulfonilo (1,1 g). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas y se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para proporcionar el compuesto del título.

1.2.4 2-(5-(1-((3-(2-azidoetoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(terc-butoxicarbonil)piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-8-carboxilato de metilo

50 A una solución del Ejemplo 1.2.3 (16,5 g) en N,N-dimetilformamida (120 ml) se le añadió azida sódica (4,22 g). La mezcla se calentó a 80 °C durante 3 horas, se enfrió, se diluyó con acetato de etilo y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida, mediante la elución con acetato de etilo al 20 % en heptanos, para proporcionar el compuesto del título.

1.2.5 Ácido 2-(5-(1-((3-(2-azidoetoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(terc-butoxicarbonil)piridin-2-il)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-8-carboxílico

60 A una solución del Ejemplo 1.2.4 (10 g) en una mezcla de tetrahidrofurano (60 ml), metanol (30 ml) y agua (30 ml) se le añadió hidróxido de litio monohidratado (1,2 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se neutralizó con HCl acuoso al 2 %. La mezcla resultante se concentró y el residuo se disolvió en acetato de etilo (800 ml) y se lavó con salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró para proporcionar el compuesto del título.

1.2.6 3-(1-((3-(2-azidoetoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(8-(benzo[d]tiazol-2-ilcarbamoil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)picolinato de terc-butilo

65 Una mezcla del Ejemplo 1.2.5 (10 g), benzo[d]tiazol-2-amina (3,24 g), hexafluorofosfato de fluoro-N,N,N',N'-

tetrametilformamidinio (5,69 g) y N,N-diisopropiletilamina (5,57 g) en N,N-dimetilformamida (20 ml) se calentó a 60 °C durante 3 horas, se enfrió y se diluyó con acetato de etilo. La mezcla resultante se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida, mediante la elución con acetato de etilo al 20 % en diclorometano para dar el compuesto del título.

1.2.7 3-(1-((3-(2-aminoetoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(8-(benzo[d]tiazol-2-ilcarbamoil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)picolinato de terc-butilo

A una solución del Ejemplo 1.2.6 (2,0 g) en tetrahidrofurano (30 ml) se le añadió Pd/C (10 %, 200 mg). La mezcla se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno durante la noche. El material insoluble se retiró por filtración y el filtrado se concentró para proporcionar el compuesto del título.

1.2.8 6-[8-(1,3-benzotiazol-2-ilcarbamoil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il]-3-[1-((3,5-dimetil-7-[(2,2,7,7-tetrametil-10,10-dióxido-3,3-difenil-4,9-dioxa-10 λ ⁶-tia-13-aza-3-silapentadecan-15-ilo)oxi]tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il]piridin-2-carboxilato de terc-butilo

A una solución del Ejemplo 1.2.7 (500 mg) en N,N-dimetilformamida (8 ml) se le añadió 4-((terc-butildifenilsilil)oxi)-2,2-dimetilbutil etenosulfonato (334 mg). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se añadió metilamina (0,3 ml) para inactivar la reacción. La mezcla resultante se agitó durante 20 minutos y se purificó mediante cromatografía de fase inversa mediante el uso de un sistema Analogix (columna C18), mediante la elución con acetonitrilo al 50-100 % en agua que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 % v/v, para proporcionar el compuesto del título.

1.2.9 Ácido 6-[8-(1,3-benzotiazol-2-ilcarbamoil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il]-3-[1-((3,5-dimetil-7-{2-[(2-sulfoetil)amino]etoxi]tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il]piridin-2-carboxílico

El Ejemplo 1.2.8 (200 mg) en diclorometano (5 ml) se trató con ácido trifluoroacético (2,5 ml) durante la noche. La mezcla de reacción se concentró y se purificó mediante cromatografía de fase inversa (columna C18), mediante la elución con acetonitrilo al 20-60 % en agua que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 % v/v, para proporcionar el compuesto del título. ¹H RMN (500 MHz, dimetilsulfóxido-*d*₆) δ ppm 12,86 (s, 1H), 8,32 (s, 2H), 8,02 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,60 (d, 1H), 7,51 (d, 1H), 7,40-7,49 (m, 2H), 7,31-7,39 (m, 2H), 7,27 (s, 1H), 6,95 (d, 1H), 4,94 (s, 2H), 3,87 (t, 2H), 3,81 (s, 2H), 3,15-3,25 (m, 2H), 3,03-3,13 (m, 2H), 3,00 (t, 2H), 2,79 (t, 2H), 2,09 (s, 3H), 1,39 (s, 2H), 1,22-1,34 (m, 4H), 0,94-1,18 (m, 6H), 0,85 (s, 6H). MS (ESI) m/e 854,1 (M + H)⁺.

1.20.1 2-((3,5-dimetil-7-((5-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1H-pirazol-1-il)metil)adamantan-1-il)oxi)etanol

A una solución del Ejemplo 1.1.6 (9 g) y diclorometano de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio(II) (827 mg) en acetonitrilo (60 ml) se le añadió trietilamina (10 ml) y pinacolborano (6 ml). La mezcla se agitó a reflujo durante la noche, se enfrió y se usó directamente en la siguiente etapa. MS (ESI) m/e 445,4 (M + H)⁺.

1.20.2 6-cloro-3-(1-((3-(2-hidroxietoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il) picolinato de terc-butilo

A una solución de 3-bromo-6-cloropicolinato de terc-butilo (5,92 g) en tetrahidrofurano (60 ml) y agua (30 ml) se le añadió el Ejemplo 1.20.1 bruto (4,44 g), 1,3,5,7-tetrametil-6-fenil-2,4,8-trioxa-6-fosfaadamante (1,5 g), tris(dibencilidenoacetona)dipaladio(0) (927 mg) y K₃PO₄ (22 g). La mezcla se agitó a reflujo durante la noche, se enfrió, se diluyó con acetato de etilo (800 ml) y se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida, mediante la elución con acetato de etilo al 20 % en heptano seguido de metanol al 5 % en diclorometano, para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 531,1 (M + H)⁺.

1.43.1 3-(1-((3-(2-hidroxietoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(8-(metoxycarbonil)naftalen-2-il) picolinato de terc-butilo

A una solución de 7-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1-naftoato de metilo (2,47 g) en 1,4-dioxano (40 ml) y agua (20 ml) se le añadió el Ejemplo 1.20.2 (4,2 g), dicloruro de bis (trifenilfosfina)paladio(II) (556 mg) y fluoruro de cesio (3,61 g) y la reacción se agitó a reflujo durante la noche. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (400 ml) y se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. La filtración y evaporación del solvente dio un residuo que se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con acetato de etilo al 20 % en heptano seguido de metanol al 5 % en diclorometano, para proporcionar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 680,7 (M + H)⁺.

1.43.2 3-(1-((3,5-dimetil-7-(2-((metilsulfonil)oxi)etoxi)adamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(8-(metoxycarbonil)naftalen-2-il)picolinato de terc-butilo

A una solución fría (0 °C) del Ejemplo 1.43.1 (725 mg) en diclorometano (10 ml) y trietilamina (0,5 ml) se le añadió

cloruro de metanosulfonilo (0,249 ml) y la mezcla se agitó durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. La filtración y evaporación del solvente dieron el producto del título, que se usó en la siguiente reacción sin purificación adicional. MS (ESI) m/e 759,9 (M + H)⁺.

1.43.3 3-(1-(((3-(2-azidoetoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(8-(metoxicarbonil)naftalen-2-il)picolinato de terc-butilo

A una solución del Ejemplo 1.43.2 (4,2 g) en N,N-dimetilformamida (30 ml) se le añadió azida sódica (1,22 g) y la mezcla se agitó durante 96 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (600 ml), se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. La filtración y evaporación del solvente proporcionaron el compuesto del título. MS (ESI) m/e 705,8 (M+H)⁺.

1.43.4 Ácido 7-(5-(1-((3-(2-azidoetoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(terc-butoxicarbonil)piridin-2-il)-1-naftoico

A una solución del Ejemplo 1.43.3 (3,5 g) en tetrahidrofurano/metanol/agua (2:1:1, 30 ml) se le añadió hidróxido de litio monohidratado (1,2 g) y la mezcla se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se acidificó con HCl acuoso 1 N y se diluyó con acetato de etilo (600 ml), se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. La filtración y evaporación del solvente proporcionaron el compuesto del título. MS (ESI) m/e 691,8 (M + H)⁺.

1.43.5 3-(1-((3-(2-azidoetoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(8-(benzo[d]tiazol-2-ilcarbamoyl)naftalen-2-il)picolinato de terc-butilo

A una solución del Ejemplo 1.43.4 (870 mg) en N,N-dimetilformamida (10 ml) se le añadió benzo[d]tiazol-2-amina (284 mg), fluoro-N,N,N',N'- hexafluorofosfato de tetrametilformamidinio (499 mg) y N,N-diisopropiletilamina (488 mg). La mezcla se agitó a 60 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. La filtración y evaporación del solvente proporcionaron el compuesto del título. MS (ESI) m/e 824,1 (M + H)⁺.

1.43.6 3-(1-((3-(2-aminoetoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(8-(benzo[d]tiazol-2-ilcarbamoyl)naftalen-2-il)picolinato de terc-butilo

A una solución del Ejemplo 1.43.5 (890 mg) en tetrahidrofurano (30 ml) se le añadió Pd/C (90 mg). La mezcla se agitó bajo 1 atmósfera de hidrógeno durante la noche. Se filtró la mezcla de reacción y se lavó el catalizador con acetato de etilo. El solvente se evaporó para proporcionar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 798,1 (M + H)⁺.

1.43.7 Ácido 6-[8-(1,3-benzotiazol-2-ilcarbamoyl)naftalen-2-il]-3-[1-((3,5-dimetil-7-{2-[(2-sulfoetil)amino]etoxi}tricyclo[3.3.1.1^{3,7}] dec-1-il)metil}-5-metil-1H-pirazol-4-il)piridin-2-carboxílico

A una solución del Ejemplo 1.43.6 (189 mg) en N,N-dimetilformamida (6 ml) se le añadió 4-((terc-butildifenilsilil)oxi)-2,2-dimetilbutil etenosulfonato (106 mg). La mezcla se agitó durante 4 días. La mezcla se diluyó con acetato de etilo (300 ml) y se lavó con agua y salmuera y se secó sobre sulfato de sodio. Después de filtrar y evaporar el solvente, el residuo se disolvió en ácido trifluoroacético (10 ml) y se saturó durante la noche. El ácido trifluoroacético se evaporó al vacío y el residuo se disolvió en dimetilsulfóxido/metanol (1:1, 6 ml). La mezcla se purificó mediante HPLC de fase inversa (sistema Gilson), mediante la elución con acetonitrilo al 10-85 % en agua que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 % v/v, para dar el compuesto del título. ¹H RMN (400 MHz, dimetilsulfóxido-*d*₆) δ ppm 13,09 (s, 1H), 9,02 (s, 1H), 8,31-8,43 (m, 3H), 8,16-8,26 (m, 3H), 7,93-8,08 (m, 3H), 7,82 (d, 1H), 7,66-7,75 (m, 1H), 7,46-7,55 (m, 2H), 7,37 (t, 1H), 3,90 (s, 3H), 3,17-3,28 (m, 2 H), 3,07-3,16 (m, 2 H), 2,82 (t, 2H), 2,24 (s, 3H), 1,44 (s, 2H), 0,99-1,37 (m, 12H), 0,87 (s, 6H). MS (ESI) m/e 849,1 (M + H)⁺.

1.85 Síntesis del ácido 6-[8-(1,3-benzotiazol-2-ilcarbamoyl)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il]-3-[1-((3- (2-((3S))-3,4-dihidroxibutil)amino)etoxi)-5,7-dimetiltricyclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il]metil}-5-metil-1H-pirazol-4-il]piridina-2-carboxílico (W2.85)

A una solución del Ejemplo 1.2.7 (213 mg) en diclorometano (2 ml) se le añadió (S)-2-(2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il)acetaldehído (42 mg). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (144 mg). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió ácido trifluoroacético (2 ml) y se continuó mediante agitación durante la noche. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se purificó por HPLC de fase inversa mediante el uso de un sistema Gilson, mediante la elución con acetonitrilo al 5-85 % en agua que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 % v/v. Las fracciones deseadas se combinaron y se liofilizaron para proporcionar el compuesto del título. ¹H RMN (400 MHz, dimetilsulfóxido-*d*₆) δ ppm 12,86 (s, 1H), 8,22 (d, 2H), 8,05 - 8,01 (m, 1H), 7,79 (d, 1H), 7,61 (d, 1H), 7,53 - 7,41 (m, 3H), 7,36 (td, 2H), 7,28 (s, 1H), 6,95 (d, 1H), 4,95 (s, 2H), 3,88 (t, 2H), 3,82 (s, 2H), 3,26 - 2,94 (m, 7H), 2,10 (s, 3H), 1,84 - 1,75 (m, 1H), 1,52-1,63 (m, 1H), 1,45 - 1,23 (m, 6H), 1,19 - 0,96 (m, 7H), 0,86 (s, 6H). MS (ESI) m/e 834,3 (M + H)⁺.

Ejemplo 2: Síntesis de los Sintones Ilustrativos

Este ejemplo proporciona métodos sintéticos para sintones ilustrativos útiles para hacer ADC.

5 2.49 Ácido 3-(1-(((1r,3r)-3-(2-(((4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)encil)oxi)carbonil)(2-sulfoetil)amino)etoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(8-(benzo[d]tiazol-2-ilcarbamoil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)picolínico

10 Una solución del Ejemplo 1.2.9 (0,045 g) (9H-fluoren-9-il)metil((S)-3-metil-1-(((S)-1-(((4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-1-oxobutan-2-il)carbamato (0,043 g) y N,N-diisopropiletilamina (0,041 ml) se agitaron juntas en N,N-dimetilformamida (1 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante la noche, se añadió dietilamina (0,024 ml) a la reacción y se continuó la agitación durante 2 horas. La reacción se detuvo con ácido trifluoroacético y luego se purificó por HPLC de fase inversa mediante el uso de un sistema Gilson, mediante la elución con acetonitrilo al 10-75 % en agua que contenía ácido trifluoroacético al 0,1 % v/v. Las fracciones deseadas se combinaron y se liofilizaron para proporcionar el compuesto del título.

15 2.119.1 (3R,7aS)-3-feniltetrahidropirrolol[1,2-c]oxazol-5(3H)-ona

20 Una mezcla de (S)-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-ona (25 g), benzaldehído (25,5 g) y ácido para-toluenosulfónico monohidratado (0,50 g) en tolueno (300 ml) se calentó a reflujo mediante el uso de una trampa Dean-Stark bajo un tubo de secado durante 16 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y el solvente se decantó de los materiales insolubles. La capa orgánica se lavó con una mezcla de bicarbonato de sodio acuoso saturado (2x) y salmuera (1x). La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice, mediante la elución con heptano/acetato de etilo 35/65, para dar el compuesto del título. MS (DCI) m/e 204,0 (M + H)⁺.

25 2.119.2 (3R,6R,7aS)-6-bromo-3-feniltetrahidropirrolol[1,2-c]oxazol-5 (3H)-ona

30 A una mezcla fría (-77 °C) del Ejemplo 2.119.1 (44,6 g) en tetrahidrofurano (670 ml) se le añadió bis(trimetilsilil)amida de litio (1,0 M en hexanos, 250 ml) gota a gota durante 40 minutos, manteniendo la T_{rxn} < -73 °C. La reacción se agitó a -77 °C durante 2 horas y se añadió gota a gota bromo (12,5 ml) durante 20 minutos, manteniendo la T_{rxn} < -64 °C. La reacción se agitó a -77 °C durante 75 minutos y se inactivó mediante la adición de 150 ml de una mezcla de tiosulfato de sodio acuosa al 10 % fría a la reacción de -77 °C. La reacción se calentó a temperatura ambiente y se distribuyó entre una mezcla acuosa semisaturada de cloruro de amonio y acetato de etilo. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con un gradiente de heptano/acetato de etilo 80/20, 75/25 y 70/30 para dar el compuesto del título. MS (DCI) m/e 299,0 y 301,0 (M+NH₃+H)⁺.

40 2.119.4 (3R,6S,7aS)-6-azido-3-feniltetrahidropirrolol[1,2-c]oxazol-5(3H)-ona

45 A una mezcla del Ejemplo 2.119.2 (19,3 g) en N,N-dimetilformamida (100 ml) se le añadió azida de sodio (13,5 g). La reacción se calentó a 60 °C durante 2,5 horas. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se inactivó mediante la adición de agua (500 ml) y acetato de etilo (200 ml). Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera. Las capas acuosas combinadas se volvieron a extraer con acetato de etilo (50 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con 78/22 de heptano/acetato de etilo, para dar el compuesto del título. MS (DCI) m/e 262,0 (M+NH₃+H)⁺.

50 2.119.5 (3R,6S,7aS)-6-amino-3-feniltetrahidropirrolol[1,2-c] oxazol-5 (3H)-ona

55 A una mezcla del Ejemplo 2.119.4 (13,5 g) en tetrahidrofurano (500 ml) y agua (50 ml) se le añadió trifenilfosfina soportada por polímeros (55 g). La reacción se agitó mecánicamente durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se filtró a través de tierra de diatomeas, mediante la elución con acetato de etilo y tolueno. La mezcla se concentró a presión reducida, se disolvió en diclorometano (100 ml), se secó con sulfato de sodio, luego se filtró y se concentró para dar el compuesto del título, que se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional. MS (DCI) m/e 219,0 (M+H)⁺.

60 2.119.7 (3R,6S,7aS)-6-(dibencilamino)-3-feniltetrahidropirrolol[1,2-c]oxazol-5(3H)-ona

65 A una mezcla del Ejemplo 2.119.5 (11,3 g) en N,N-dimetilformamida (100 ml) se le añadió carbonato de potasio (7,0 g), yoduro de potasio (4,2 g) y bromuro de bencilo (14,5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche y se detuvo mediante la adición de agua y acetato de etilo. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera. Las capas acuosas combinadas se volvieron a extraer con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con un gradiente de acetato de etilo del 10 al 15 % en

heptano para dar un sólido que se trituró con heptano para dar el compuesto del título. MS (DCI) m/e 399,1 (M + H)⁺.

2.119.7 (3S,5S)-3-(dibencilamino)-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-ona

- 5 A una mezcla del Ejemplo 2.119.6 (13 g) en tetrahidrofurano (130 ml) se le añadió ácido *paratoluenosulfónico* monohidratado (12,4 g) y agua (50 ml), y la reacción se calentó a 65 °C durante 6 días. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y se inactivó mediante la adición de bicarbonato de sodio acuoso saturado y acetato de etilo. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera. Las capas acuosas combinadas se volvieron a extraer con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Los sólidos cerosos se trituraron con heptano (150 ml) para dar el compuesto del título. S (DCI) m/e 311,1 (M+H)⁺.

2.119.8 (3S,5S)-5-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-3-(dibencilamino)pirrolidin-2-ona

- 15 A una mezcla del Ejemplo 2.119.7 (9,3 g) y 1H-imidazol (2,2 g) en N,N-dimetilformamida se le añadió *terc*-butilclorodimetilsilano (11,2 ml, 50 % en peso en tolueno) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de agua y éter etílico. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera. Las capas acuosas combinadas se volvieron a extraer con éter dietílico. Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con acetato de etilo al 35 % en heptano, para dar el compuesto del título. MS (DCI) m/e 425,1 (M+H)⁺.

2.119.9 2-((3S,5S)-5-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-3-(dibencilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)acetato de *terc*-butilo

- 25 A una mezcla fría (0 °C) del Ejemplo 2.119.8 (4,5 g) en tetrahidrofurano (45 ml) se le añadió hidruro de sodio al 95 % (320 mg) en dos porciones. La mezcla fría se agitó durante 40 minutos y se añadió 2-bromoacetato de *terc*-butilo (3,2 ml). La reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La reacción se detuvo mediante la adición de agua y acetato de etilo. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera. Las capas acuosas combinadas se volvieron a extraer con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con un gradiente de acetato de etilo al 5-12 % en heptano, para dar el compuesto del título. MS (DCI) m/e 539,2 (M+H)⁺.

2.119.10 2-((3S,5S)-3-(dibencilamino)-5-(hidroximetil)-2-oxopirrolidin-1-il)acetato de *terc*-butilo

- 35 A una mezcla del Ejemplo 2.119.9 (5,3 g) en tetrahidrofurano (25 ml) se le añadió fluoruro de *tetrabutylamonio* (11 ml, 1,0 M en 95/5 tetrahidrofurano/agua). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora y luego se inactivó mediante la adición de una mezcla acuosa saturada de cloruro de amonio, agua y acetato de etilo. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera. Las capas acuosas combinadas se volvieron a extraer con acetato de etilo. Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con acetato de etilo al 35 % en heptano, para dar el compuesto del título. MS (DCI) m/e 425,1 (M+H)⁺.

2.119.11 2-((3S,5S)-5-((2-((4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)-2,2-dimetilbutoxi)sulfonyl)etoxi)metil)-3-(dibencilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)acetato de *terc*-butilo

- 50 A una mezcla del Ejemplo 2.119.10 (4,7 g) en dimetilsulfóxido (14 ml) se le añadió una mezcla de 4-(((terc-butildifenilsilil)oxi)-2,2-etenosulfonato de dimetilbutilo (14,5 g) en dimetilsulfóxido (14 ml). Se añadieron carbonato de potasio (2,6 g) y agua (28 µL) y la reacción se calentó a 60 °C bajo nitrógeno durante un día. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y luego se inactivó mediante la adición de una mezcla de salmuera, agua y éter dietílico. Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera. Las capas acuosas combinadas se volvieron a extraer con éter dietílico. Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con un gradiente de acetato de etilo al 15-25 % en heptano, para dar el compuesto del título. MS (ESI⁺) m/e 871,2 (M+H)⁺.

2.119.12 2-((3S,5S)-3-amino-5-((2-((4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)-2,2-dimetilbutoxi)sulfonyl)etoxi)metil)-2-oxopirrolidin-1-il)acetato de *terc*-butilo

- 60 El ejemplo 2.119.11 (873 mg) se disolvió en acetato de etilo (5 ml) y metanol (15 ml) y se añadió hidróxido de paladio sobre carbono, 20 % en peso (180 mg). La mezcla de reacción se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno (30 psi) a temperatura ambiente durante 30 horas, luego a 50 °C durante una hora. La reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y se concentró para dar el producto deseado. MS (ESI⁺) m/e 691,0 (M+H)⁺.

2.119.13 Ácido 4-(((3S,5S)-1-(2-(*terc*-butoxi)-2-oxoetil)-5-((2-((4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)-2,2-dimetilbutoxi)sulfonyl)etoxi)metil)-2-oxopirrolidin-3-il)amino)-4-oxobut-2-enoico

- 65

Se disolvió anhídrido maleico (100 mg) en diclorometano (0,90 ml) y se añadió gota a gota una mezcla del Ejemplo 2.119.12 (650 mg) en diclorometano (0,90 ml) y después se calentó a 40 °C durante 2 horas. La mezcla de reacción se purificó directamente mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con un gradiente de metanol al 1,0-2,5 % en diclorometano que contenía ácido acético al 0,2 %. Después de concentrar las fracciones que contienen producto, se añadió tolueno (10 ml) y la mezcla se concentró de nuevo para dar el compuesto del título. MS (ESI-) m/e 787,3 (M-H)⁺.

2.119.14 2-((3S,5S)-5-((2-((4-((terc-butildimetilsilil)oxi)-2,2-dimetilbutoxi)sulfonil)etoxi)metil)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2-oxopirrolidin-1-il)acetato de terc-butilo

El ejemplo 2.119.13 (560 mg) se suspendió en tolueno (7 ml) y se añadieron trietilamina (220 µl) y sulfato de sodio (525 mg). La reacción se calentó a reflujo bajo una atmósfera de nitrógeno durante 6 horas y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se filtró y los sólidos se aclararon con acetato de etilo. El eluyente se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con heptano/acetato de etilo 45/55 para dar el compuesto del título.

2.119.15 Ácido 2-((3S,5S)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2-oxo-5-((2-sulfoetoxi)metil)pirrolidin-1-il)acético

El ejemplo 2.119.14 (1,2 g) se disolvió en ácido trifluoroacético (15 ml) y se calentó a 65-70 °C bajo nitrógeno durante la noche. El ácido trifluoroacético se eliminó a presión reducida. El residuo se disolvió en acetonitrilo (2,5 ml) y se purificó mediante cromatografía líquida preparativa de fase inversa en una columna Luna C18(2) AXIA (250 x 50 mm, tamaño de partícula de 10 µm) mediante el uso de un gradiente de acetonitrilo al 5-75 % que contenía 0,1 % de ácido trifluoroacético en agua durante 30 minutos, para dar el compuesto del título. MS (ESI-) m/e 375,2 (M-H)⁺.

2.119.16 Ácido 3-(1-((3-(2-(((4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)-5-ureidopentanamido)bencil)oxi)carbonil)(2-sulfoetil)amino)etoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(8-(benzo[d]tiazol-2-ilcarbamoi)naftalen-2-il)picolínico

El compuesto del título se preparó mediante la sustitución del Ejemplo 1.43.7 por el Ejemplo 1.2.9 en el Ejemplo 2.49.1. MS (ESI-) m/e 1252,4 (M-H)⁺.

2.119.17 N -(((3S,5S)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2-oxo-5-[(2-sulfoetoxi)metil]pirrolidin-1-il)acetil)-L-valil-N-{4-[[[2-((3-[[4-[[6-[[8-(1,3-benzotiazol-2-ilcarbamoi)naftalen-2-il]-2-carboxipiridin-3-il]-5-metil-1H-pirazol-1-il)metil]-5,7-dimetiltriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)oxi]etil](2-sulfoetil)carbamoi)oxi)metil]fenil}-N5-carbamoi-L-ornitinamida

El ejemplo 2.119.15 (7 mg) se disolvió en N,N-dimetilformamida (0,15 ml) y se añadieron hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (9 mg) y N,N-diisopropiletilamina (7 µl). La mezcla se agitó durante 3 minutos a temperatura ambiente y se añadió a una mezcla del Ejemplo 2.119.16 (28 mg) y N,N-diisopropiletilamina (15 µl) en N,N-dimetilformamida (0,15 ml). Después de 1 hora, la reacción se diluyó con N,N-dimetilformamida/agua 1/1 (1,0 ml) y se purificó por cromatografía de fase inversa (columna C18), mediante la elución con acetonitrilo al 5-75 % en agua TFA al 0,1 %, para proporcionar el compuesto del título. ¹H RMN (500 MHz, dimetilsulfóxido-d₆) δ ppm 9,95 (s, 1H), 9,02 (s, 1H), 8,37 (d, 1H), 8,22 (m, 2H), 8,18 (m, 2H), 8,08 (m, 2H), 8,03 (m, 1H), 7,96 (br d, 1H), 7,81 (d, 1H), 7,70 (t, 1H), 7,61 (br m, 3H), 7,48 (m, 2H), 7,37 (t, 1H), 7,27 (br m, 2H), 7,08 (s, 2H), 4,99 (br d, 3H), 4,68 (t, 1H), 4,39 (m, 1H), 4,20 (m, 2H), 4,04 (m, 1H), 3,87 (br d, 2H), 3,74 (br m, 1H), 3,65 (br t, 2H), 3,48 (br m, 4H), 3,43 (br m, 2H), 3,26 (br m, 2H), 3,00 (br m, 2H), 2,80 (m, 1H), 2,76 (m, 1H), 2,66 (br m, 2H), 2,36 (br m, 1H), 2,22 (s, 3H), 2,00 (m, 1H), 1,87 (m, 1H), 1,69 (br m, 1H), 1,62 (br m, 1H), 1,40 (br m, 4H), 1,31-1,02 (m, 10H), 0,96 (m, 2H), 0,85 (m, 12H). MS (ESI-) m/e 1610,3 (M-H)⁺.

2.123 Síntesis del ácido (6S)-2,6-anhidro-6-(2-{2-[[[2-((3-[[4-[[6-[[8-(1,3-benzotiazol-2-ilcarbamoi)-3,4-dihidroisquinolin-2(1H)-il]-2-carboxipiridin-3-il]-5-metil-1H-pirazol-1-il)metil]-5,7-dimetiltriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)oxi]etil](2-sulfoetil)carbamoi)oxi)metil]-5-((N-[(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)acetil]-L-valil-L-alanil)amino)fenil)etil)-L-gulónico (Sintón SZ)

2.123.1 (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benciloxi)-6-(benciloximetil)-tetrahidropiran-2-ona

A una mezcla de (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benciloxi)-6-(benciloximetil)-tetrahidro-2H-piran-2-ol (75 g) en dimetilsulfóxido (400 ml) a 0 °C se le añadió anhídrido acético (225 ml). La mezcla se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente antes de enfriarse a 0 °C. Se añadió un gran volumen de agua y se detuvo la agitación de modo que se dejó reposar la mezcla de reacción durante 3 horas (la lactona bruta migró al fondo del matraz). Se eliminó el sobrenadante y la mezcla bruta se diluyó con acetato de etilo y se lavó 3 veces con agua, se neutralizó con una mezcla acuosa saturada de NaHCO₃ y se lavó de nuevo dos veces con agua. Después, la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 561 (M+Na)⁺.

2.123.2 (3R,4S,5R,6R)-3,4,5-tris(benciloxi)-6-(benciloximetil)-2-etinil-tetrahidro-2H-piran-2-ol

A una mezcla de etiniltrimetilsilano (18,23 g) en tetrahidrofurano (400 ml) bajo nitrógeno y enfriada en un baño de

hielo seco/acetona (temperatura interna -65 °C) se le añadió BuLi 2,5 M en hexano (55,7 ml) gota a gota, manteniendo la temperatura más abajo de -60 °C. La mezcla se agitó en un baño frío durante 40 minutos, seguido de un baño de agua helada (la temperatura interna aumentó a 0,4 °C) durante 40 minutos y finalmente se enfrió de nuevo a -75 °C. Se añadió gota a gota una mezcla del Ejemplo 2.123.1 (50 g) en tetrahidrofurano (50 ml), manteniendo la temperatura interna más abajo de -70 °C. La mezcla se agitó en un baño de hielo seco/acetona durante 3 horas más. La reacción se inactivó con una mezcla de NaHCO_3 acuoso saturado (250 ml). La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente, se extrajo con acetato de etilo (3 x 300 ml), se secó sobre MgSO_4 , se filtró, y se concentró al vacío para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 659 (M+Na)⁺.

2.123.3 trimetil(((3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tris(benciloxi)-6-(benciloximetil)-tetrahydro-2H-piran-2-il)etnil)silano

A una mezcla mixta del Ejemplo 2.123.2 (60 g) en acetonitrilo (450 ml) y diclorometano (150 ml) a -15 °C en un baño de hielo y sal se le añadió trietilsilano (81 ml) gota a gota, seguido de la adición del complejo de éter dietílico de trifluoruro de boro (40,6 ml) a una velocidad tal que la temperatura interna no supere los -10 °C. A continuación, la mezcla se agitó de -15 °C a -10 °C durante 2 horas. La reacción se inactivó con una mezcla de NaHCO_3 acuoso saturado (275 ml) y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 550 ml). Los extractos se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida mediante la elución con un gradiente de acetato de etilo/éter de petróleo del 0 % al 7 % para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 643 (M+Na)⁺.

2.123.4 (2R,3R,4R,5S)-3,4,5-tris(benciloxi)-2-(benciloximetil)-6-etnil-tetrahydro-2H-pirano

A una mezcla mixta del Ejemplo 2.123.3 (80 g) en diclorometano (200 ml) y metanol (1000 ml) se le añadió una mezcla acuosa de NaOH (258 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se eliminó el solvente. Después, el residuo se distribuyó entre agua y diclorometano. Los extractos se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 571 (M+Na)⁺.

2.123.5 (2R,3R,4R,5S)-2-(acetoximetil)-6-etnil-tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triiltriacetato

A una mezcla del Ejemplo 2.123.4 (66 g) en anhídrido acético (500 mL) enfriada mediante un baño de hielo/agua se le añadió el complejo de éter dietílico de trifluoruro de boro (152 mL) gota a gota. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas, se enfrió con un baño de hielo/agua y se neutralizó con la mezcla acuosa saturada de NaHCO_3 . La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 500 ml), se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida mediante la elución con un gradiente de acetato de etilo/éter de petróleo del 0 % al 30 % para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 357 (M+H)⁺.

2.123.6 (3R,4R,5S,6R)-2-etnil-6-(hidroximetil)-tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triol

A una mezcla del Ejemplo 2.123.5 (25 g) en metanol (440 ml) se le añadió metanolato de sodio (2,1 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se neutralizó con HCl 4 M en dioxano. Se eliminó el solvente y el residuo se adsorbió sobre gel de sílice y se cargó en una columna de gel de sílice. La columna se eluyó con un gradiente de 0 a 100 % de acetato de etilo/éter de petróleo y luego 0 % a 12 % de metanol/acetato de etilo para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 211 (M+Na)⁺.

2.123.7 Ácido (2S,3S,4R,5R)-6-etnil-3,4,5-trihidroxi-tetrahydro-2H-piran-2-carboxílico

Un matraz de fondo redondo de tres bocas se cargó con el Ejemplo 2.123.6 (6,00 g), KBr (0,30 g), bromuro de tetrabutilamonio (0,41 g) y 60 mL de mezcla acuosa saturada de NaHCO_3 . Se añadió TEMPO ((2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)oxilo, 0,15 g) en 60 ml de diclorometano. La mezcla se agitó vigorosamente y se enfrió en un baño de hielo y sal a una temperatura interna de -2 °C. Se añadió una mezcla de salmuera (12 ml), se mezcló acuosa de NaHCO_3 (24 ml) y NaOCl (154 ml) gota a gota de manera que la temperatura interna se mantuvo por debajo de 2 °C. El pH de la mezcla de reacción se mantuvo en el intervalo de 8,2 a 8,4 con la adición de Na_2CO_3 sólido. Después de un total de 6 horas, la mezcla de reacción se enfrió a una temperatura interna de 3 °C y se añadió etanol (~20 ml) gota a gota. La mezcla se agitó durante 30 minutos. La mezcla se transfirió a un embudo de decantación y se descartó la capa de diclorometano. El pH de la capa acuosa se ajustó a 2-3 mediante el uso de HCl acuoso 1 M. Después, la capa acuosa se concentró hasta sequedad para producir un sólido. Se añadió metanol (100 ml) al sólido seco y la suspensión se agitó durante ~30 minutos. La mezcla se filtró sobre una capa de tierra de diatomeas y el residuo en el embudo se lavó con ~100 ml de metanol. El filtrado se concentró a presión reducida para obtener el compuesto del título.

2.123.8 (2S,3S,4R,5R)-6-etnil-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxilato de metilo

Se cargó un matraz de fondo redondo de tres bocas de 500 mL con una suspensión del Ejemplo 2.123.7 (6,45 g) en metanol (96 ml) y se enfrió en un baño de hielo y sal con una temperatura interna de -1 °C. Se añadió cuidadosamente cloruro de tionilo puro (2,79 ml). La temperatura interna siguió aumentando durante la adición, pero no excedió los 10 °C. Se dejó que la reacción se calentara lentamente hasta 15-20 °C durante 2,5 horas. Después

de 2,5 horas, se concentró la reacción para dar el compuesto del título.

2.123.9 (3S,4R,5S,6S)-2-etinil-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triiltriacetato

Al Ejemplo 2.123.8 (6,9 g) como una mezcla en N,N-dimetilformamida (75 ml) se le añadió 4-(dimetilamino)piridina (0,17 g) y anhídrido acético (36,1 ml). La suspensión se enfrió en un baño de hielo y se añadió piridina (18,04 ml) mediante una jeringa durante 15 minutos. Se dejó calentar la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añadieron más anhídrido acético (12 ml) y piridina (6 ml) y se continuó la agitación durante 6 horas más. La reacción se enfrió en un baño de hielo y se añadió 250 ml de mezcla acuosa saturada de NaHCO₃ y se agitó durante 1 hora. Se añadió agua (100 ml) y la mezcla se extrajo con acetato de etilo. El extracto orgánico se lavó dos veces con una mezcla saturada de CuSO₄, se secó, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida, mediante la elución con acetato de etilo/éter de petróleo al 50 % para dar el compuesto del título. ¹H RMN (500 MHz, metanol-*d*₄) δ ppm 5,29 (t, 1H), 5,08 (td, 2H), 4,48 (dd, 1H), 4,23 (d, 1H), 3,71 (s, 3H), 3,04 (d, 1H), 2,03 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 1,98 (s, 4H).

2.123.10 Ácido 2-yodo-4-nitrobenzoico

Se cargó un matraz totalmente encamisado de 3 L equipado con un agitador mecánico, sonda de temperatura y un embudo de adición en atmósfera de nitrógeno, con ácido 2-amino-4-nitrobenzoico (69,1 g, Combi-Blocks) y ácido sulfúrico, 1,5 M acuoso (696 ml). La suspensión resultante se enfrió a una temperatura interna de 0 °C y se añadió gota a gota una mezcla de nitrito de sodio (28,8 g) en agua (250 ml) durante 43 minutos con la temperatura mantenida por debajo de 1 °C. La reacción se agitó a aprox. 0 °C durante 1 hora. Se añadió gota a gota una mezcla de yoduro de potasio (107 g) en agua (250 ml) durante 44 minutos con la temperatura interna mantenida por debajo de 1 °C. (Inicialmente la adición fue exotérmica y hubo desprendimiento de gas). La reacción se agitó durante 1 hora a 0 °C. La temperatura se elevó a 20 °C y luego se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se convirtió en suspensión. La mezcla de reacción se filtró y el sólido recogido se lavó con agua. El sólido húmedo (~ 108 g) se agitó en sulfito de sodio al 10 % (350 ml, con ~ 200 ml de agua usada para lavar en el sólido) durante 30 minutos. La suspensión se acidificó con ácido clorhídrico concentrado (35 ml) y el sólido se recogió por filtración y se lavó con agua. El sólido se suspendió en agua (1 l) y se volvió a filtrar, y el sólido se dejó secar en el embudo durante la noche. A continuación, se secó el sólido en un horno de vacío durante 2 horas a 60 °C. El sólido resultante se trituró con diclorometano (500 ml) y la suspensión se filtró y se lavó con más diclorometano. El sólido se secó al aire para dar el compuesto del título.

2.123.11 (2-yodo-4-nitrofenil)metanol

Se cargó un matraz de 3 bocas de 3 L secado a la llama con el Ejemplo 2.123.10 (51,9 g) y tetrahidrofurano (700 ml). La mezcla se enfrió en un baño de hielo a 0,5 °C y se añadió gota a gota el complejo de boranotetrahidrofurano (443 ml, 1 M en THF) (desprendimiento de gas) durante 50 minutos, alcanzando una temperatura interna final de 1,3 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 15 minutos y se retiró el baño de hielo. Se dejó que la reacción alcanzara la temperatura ambiente durante 30 minutos. Se instaló una manta calefactora y la reacción se calentó a una temperatura interna de 65,5 °C durante 3 horas y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente mientras se agitaba durante la noche. La mezcla de reacción se enfrió en un baño de hielo a 0 °C y se inactivó mediante la adición gota a gota de metanol (400 ml). Después de un breve período de incubación, la temperatura se elevó rápidamente a 2,5 °C con desprendimiento de gas. Después de agregar los primeros 100 ml durante aproximadamente 30 minutos, la adición dejó de ser exotérmica y cesó el desprendimiento de gas. Se retiró el baño de hielo y se agitó la mezcla a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante la noche. La mezcla se concentró hasta un sólido, se disolvió en diclorometano/metanol y se adsorbió sobre gel de sílice (~ 150 g). El residuo se cargó en un lecho corto de gel de sílice (3000 ml) y se eluyó con diclorometano para dar el compuesto del título.

2.123.12 (4-amino-2-yodofenil)metanol

Se cargó un matraz de 5 l equipado con un agitador mecánico, manto calefactor controlado por una sonda de temperatura JKEM y un condensador con el Ejemplo 2.123.11 (98,83 g) y etanol (2 l). La reacción se agitó rápidamente y se añadió hierro (99 g), seguido de una mezcla de cloruro de amonio (20,84 g) en agua (500 ml). La reacción se calentó en el transcurso de 20 minutos a una temperatura interna de 80,3 °C, donde comenzó a refluir vigorosamente. Se dejó caer el manto hasta que se calmó el reflujo. Después de eso, la mezcla se calentó a 80 °C durante 1,5 horas. La reacción se filtró en caliente a través de un filtro de membrana y el residuo de hierro se lavó con acetato de etilo/metanol caliente al 50% (800 ml). El eluyente se pasó a través de una almohadilla de tierra de diatomeas y el filtrado se concentró. El residuo se repartió entre salmuera al 50 % (1500 ml) y acetato de etilo (1500 ml). Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (400 ml x 3). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron para dar el compuesto del título, que se usó sin purificación adicional.

2.123.13 4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-3-yodoanilina

Se cargó un matraz de 5 L con un agitador mecánico con el Ejemplo 2.123.12 (88 g) y diclorometano (2 L). La

suspensión se enfrió en un baño de hielo a una temperatura interna de 2,5 °C y se añadió terc-butilclorodimetilsilano (53,3 g) en porciones durante 8 minutos. Después de 10 minutos, se añadió en porciones 1H-imidazol (33,7 g) a la reacción fría. La reacción se agitó durante 90 minutos mientras la temperatura interna se elevaba a 15 °C. La mezcla de reacción se diluyó con agua (3 l) y diclorometano (1 l). Las capas se separaron y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se concentró hasta un aceite. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice (1600 g de gel de sílice), mediante la elución con un gradiente de acetato de etilo al 0-25 % en heptano, para dar el compuesto del título como un aceite.

2.123.14 Ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanoico

A una mezcla de ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanoico (6,5 g) en dimetoxietano (40 ml) se le añadió ácido (S)-2-aminopropanoico (1,393 g) y bicarbonato de sodio (1,314 g) en agua (40 ml). Se añadió tetrahidrofurano (20 ml) para ayudar a la solubilidad. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. Se añadió ácido cítrico acuoso (15 %, 75 ml) y la mezcla se extrajo con 2-propanol al 10 % en acetato de etilo (2 x 100 ml). Se formó un precipitado en la capa orgánica. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (2 x 150 ml). La capa orgánica se concentró a presión reducida y luego se trituró con éter dietílico (80 ml). Después de una breve sonicación, el compuesto del título se recogió por filtración. MS (ESI) m/e 411 (M+H)⁺.

2.123.15 (9H-fluoren-9-il)metil((S)-1-(((S)-1-((4-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)-3-yodofenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato

A una mezcla del Ejemplo 2.123.13 (5,44 g) y del Ejemplo 2.123.14 (6,15 g) en una mezcla de diclorometano (70 ml) y metanol (35,0 ml) se le añadió 2-etoxiquinolin-1(2H)-carboxilato de etilo (4,08 g) y la reacción se agitó durante la noche. La mezcla de reacción se concentró y se cargó sobre gel de sílice, mediante la elución con un gradiente de heptano del 10 % al 95 % en acetato de etilo seguido de metanol al 5 % en diclorometano. Las fracciones que contenían el producto se concentraron, se disolvieron en metanol al 0,2 % en diclorometano (50 ml), se cargaron sobre gel de sílice y se eluyeron con un gradiente de metanol del 0,2 % al 2 % en diclorometano. Se recogieron las fracciones que contenían el producto para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 756,0 (M+H)⁺.

2.123.16 (2S,3S,4R,5S,6S)-2-((S)-2-(((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)fenil)etil)-6-(metoxicarbonil)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triiltriacetato

Una mezcla del Ejemplo 2.123.9 (4,500 g), Ejemplo 2.123.15 (6,62 g), yoduro de cobre (I) (0,083 g) y dicloruro de bis(trifenilfosfina)paladio (II) (0,308 g) se combinó en un vial y se desgasificó. Se añadieron N,N-dimetilformamida (45 ml) y N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (4,55 ml) y el recipiente de reacción se lavó abundantemente con nitrógeno y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se distribuyó entre agua (100 ml) y acetato de etilo (250 ml). Las capas se separaron y la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con un gradiente de acetato de etilo del 5 % al 95 % en heptano. El producto que contenía las fracciones se recogió, se concentró y se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con un gradiente de metanol en diclorometano del 0,25 % al 2,5 % para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 970,4 (M+H)⁺.

2.123.17 (2S,3S,4R,5S,6S)-2-((S)-2-(((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)-2-(((terc-butildimetilsilil)oxi)metil)fenetil)-6-(metoxicarbonil)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triiltriacetato

El ejemplo 2.123.16 (4,7 g) y tetrahidrofurano (95 ml) se añadieron a Pt/C al 5 % (2,42 g, húmedo) en una botella a presión de 50 ml y se agitó durante 90 minutos a temperatura ambiente bajo 50 psi de hidrógeno. La reacción se filtró y se concentró para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 974,6 (M+H)⁺.

2.123.18 (2S,3S,4R,5S,6S)-2-((S)-2-(((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)-2-(hidroximetil)fenetil)-6-(metoxicarbonil)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triiltriacetato

Una mezcla del Ejemplo 2.123.17 (5,4 g) en tetrahidrofurano (7 ml), agua (7 ml) y ácido acético glacial (21 ml) se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se lavó con agua (100 ml), una mezcla de NaHCO₃ acuoso saturado (100 ml), salmuera (100 ml), se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró, y se concentró. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con un gradiente de metanol del 0,5 % al 5 % en diclorometano, para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 860,4 (M+H)⁺.

2.123.19 (2S,3S,4R,5S,6S)-2-((S)-2-(((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)-2-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenetil)-6-(metoxicarbonil)tetrahydro-2H-piran-3,4,5-triiltriacetato

A una mezcla del Ejemplo 2.123.18 (4,00 g) y bis(4-nitrofenil)carbonato (2,83 g) en acetonitrilo (80 ml) se le añadió

N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (1,22 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar durante la noche, la reacción se concentró, se disolvió en diclorometano (250 ml) y se lavó con la mezcla de NaHCO₃ acuoso saturado (4 x 150 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró. La espuma resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice, mediante la elución con un gradiente de acetato de etilo del 5 % al 75 % en hexanos para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 1025,5 (M+H)⁺.

2.166 Síntesis del ácido 6-(8-(benzo[d]tiazol-2-ilcarbamoil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-3-(1-((3-(2-(((2-(2-((2S,3R,4R,5S,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-il)etilo)-4-((S)-2-((S)-2-(2-((3S,5S)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2-oxo-5-((2-sulfoetoxi)metil)pirrolidin-1-il)acetamido)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)((S)-3,4-dihidroxibutil)amino)etoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)picolínico (Sintón AAA)

El compuesto del título se preparó sustituyendo el Ejemplo 2.167.1 por el Ejemplo 2.119.16 en el Ejemplo 2.119.17. ¹H RMN (500 MHz, dimetilsulfóxido-*d*₆) δ ppm 9,86 (br d, 1H), 8,17 (br d, 1H), 8,04 (m, 2H), 7,78 (d, 1H), 7,61 (d, 1H), 7,51 (br d, 1H), 7,49-7,39 (m, 4H), 7,36 (m, 2H), 7,29 (s, 1H), 7,21 (d, 1H), 7,07 (s, 2H), 6,95 (d, 1H), 5,00 (s, 2H), 4,96 (s, 2H), 4,64 (t, 1H), 4,36 (m, 1H), 4,19 (m, 1H), 4,16 (d, 1H), 4,01 (d, 1H), 3,88 (br t, 2H), 3,82 (br m, 3H), 3,75 (br m, 1H), 3,64 (t, 2H), 3,54 (d, 2H), 3,47 (m, 4H), 3,43 (br m, 4H), 3,23 (br m, 5H), 3,13 (t, 1H), 3,10 (br m, 1H), 3,01 (br m, 2H), 2,93 (t, 1H), 2,83-2,68 (m, 3H), 2,37 (m, 1H), 2,08 (s, 3H), 1,99 (br m, 2H), 1,85 (m, 1H), 1,55 (br m, 1H), 1,37 (br m, 1H), 1,28 (br m, 6H), 1,10 (br m, 7H), 0,93 (br m, 1H), 0,88-0,69 (m, 12H). MS (ESI) m/e 1713,6 (MH)⁺.

Síntesis alternativa del ácido 6-(8-(benzo[d]tiazol-2-ilcarbamoil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-3-(1-((3-(2-(((2-(2-((2S,3R,4R,5S,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-il)etilo)-4-((S)-2-((S)-2-(2-((3S,5S)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-2-oxo-5-((2-sulfoetoxi)metil)pirrolidin-1-il)acetamido)-3-metilbutanamido)propanamido)encil)oxi)carbonil)((S)-3,4-dihidroxibutil)amino)etoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)picolínico (Sintón AAA)

2.167.1 Ácido 3-(1-((3-(2-(((4-((S)-2-((S)-2-amino-3-metilbutanamido)propanamido)-2-(2-((2S,3R,4R,5S,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-il)etil)encil)oxi)carbonil)((S)-3,4-dihidroxibutil)amino)etoxi)-5,7-dimetiladamantan-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il)-6-(8-(benzo[d]tiazol-2-ilcarbamoil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)picolínico

El ejemplo 2.167.1 se preparó sustituyendo el ejemplo 2.123.19 por (9H-fluoren-9-il)metil((S)-3-metil-1-(((S)-1-((4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil)amino)-1-oxo-5-ureidopentan-2-il)amino)-1-oxobutan-2-il)carbamato y sustituyendo el Ejemplo 1.85 por el Ejemplo 1.2.9 en el Ejemplo 2.49.1. MS (ESI) m/e 1355,5 (MH)⁺.

Ejemplo 3: Generación de Anticuerpos Monoclonales Anti-B7-H3 de Ratón mediante la Tecnología de Hibridomas de Ratón

Se generaron anticuerpos específicos de B7-H3 mediante el uso de la tecnología de hibridomas de ratón. Específicamente, se usaron como inmunógenos una línea celular de fibroblastos de ratón (3T12) que expresa B7-H3 humana de longitud completa, así como también proteínas de fusión B7-H3-ECD-Fc humana recombinante humana o de ratón, cuyas secuencias se proporcionan en la Tabla 1. Se usaron líneas celulares HCT116 humanas que expresan B7-H3 humana para determinar el título de antisueros y para seleccionar anticuerpos específicos de antígeno. Las líneas celulares se expusieron a aproximadamente 3000 mREM de radiación de fuente gamma antes de la inmunización. Dos cepas diferentes de ratones se inmunizaron en el corvejón con dosis que contiene 5 x 10⁶ células/ratón/inyección o 10 ug de proteína/ ratón/inyección en presencia del adyuvante Gerbu MM (Cooper-Casey Corporation, Valley Center, CA, EE. UU.) para inmunizaciones tanto primarias como de refuerzo. Para aumentar la respuesta inmune a B7-H3 de ratón, los ratones fueron reforzados con una mezcla de proteínas Fc humanas y B7-H3-ECD-Fc humana de ratón para los reforzamientos finales. Brevemente, los antígenos se prepararon en PBS como sigue: 200 x 10⁶ células/ml o 400 ug/ml de proteína. El volumen calculado de antígeno se transfirió a un tubo de microcentrifuga estéril y luego se añadió un volumen igual de Gerbu MM. La solución se mezcló suavemente mediante agitación con vórtex durante 1 minuto. A continuación, se extrajo la solución de adyuvante-antígeno en una jeringa adecuada para inyección en animales. Se inyectó un total de 25 µl de la mezcla en el corvejón de cada pata del ratón. Cada animal se reforzó 3 veces antes de que se determinara el título de suero para los grupos. Todos los animales recibieron 2 refuerzos adicionales con una mezcla igual de proteínas B7-H3-ECD-Fc humana de ratón y B7-H3 humana-ECD-Fc humana en adyuvante antes de la fusión.

Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de las proteínas recombinantes usadas para inmunización o cribado

| Proteína | Secuencia de Aminoácidos |
|--------------------------------------|---|
| Longitud total de la B7-H3 humana | MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPPEPG FSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRV ADEGSFTCFVSI RDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGY PEAEVFWQDQGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQ QDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIW QLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFV SIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDG QGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTIT GQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFVCWRKIKQSCEENAGAEDQDGEGEKS KTALQPLKHSKSDSKEDDQGEIA (SEQ ID NO: 149) |
| B7-H3-ECD humano (fusión a fc) | MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPPEPG FSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRV ADEGSFTCFVSI RDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGY PEAEVFWQDQGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQ QDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIW QLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFV SIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDG QGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTIT GQPMTFAAADKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (SEQ ID NO: 150) |
| B7-H3-ECD de ratón (fusión a fc) | MLRGWGGPSVGVCVRTALGVLCCLTGALEVQVSEDPVVALVDTDATLRCSFSPEPG FSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYSNRRTALFPDLLVQGNASLRLQRVRV TDEGSYTCFVSIQDFDSAASVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGNMVTITCSSYQGY PEAEVFWKDGQGVPLTGNVTTSQMANERGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQ QDAHGSVTITGQPLTFAAADKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 151) |
| B7-H3-ECD humano (marcado con His) | MEFGLSWLFLVAILKGVQCGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPPEPGFSLAQLN LIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFT CFVSI RDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFW QDQGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSV TITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQ LVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSI RDFGS AAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDQGQGVPLTG NVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTHH HHHH (SEQ ID NO: 152) |
| B7-H3-ECD de ratón (marcado con His) | MEFGLSWLFLVAILKGVQCVQVSEDPVVALVDTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLI WQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYSNRRTALFPDLLVQGNASLRLQRVRVTDEGSYTCF VSIQDFDSAASVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGNMVTITCSSYQGYPEAEVFWKD GQGVPLTGNVTTSQMANERGLFDVHSVLRVVLGANGTYS CLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPLTFHHHHHH (SEQ ID NO: 153) |
| Cyno B7-H3-ECD (marcado con His) | MLHRRGSPGMGVHVGAAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPG FSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFDLLAQGNASLRLQRVRV ADEGSFTCFVSI RDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGY PEAEVFWQDQGAPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQ QDAHGSITITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIW QLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFV SIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDG QGAPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTIT GQPMTFAAAHHHHHHHH (SEQ ID NO: 154) |

Nota: las secuencias líderes, Fc e His están subrayadas

Fusión y detección de hibridomas

Se cultivaron células de la línea celular de mieloma murino (NS-0, ECACC Núm. 85110503) para alcanzar la fase logarítmica justo antes de la fusión. Se extrajeron los ganglios linfáticos poplíteos e inguinales de cada ratón y se prepararon de forma estéril suspensiones de células individuales. Los linfocitos se fusionaron con células de mieloma (E. Harlow, D. Lane, Antibody: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1998); Kohler G. y Milstein C., "Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefined specificity", Nature, 256:495-497 (1975); BTX Harvard Apparatus (Holliston, MA, EE. UU.) ECM 2001 manual técnico). Las células híbridas fusionadas se distribuyeron en placas de 96 pocillos en medio DMEM/10 % FBS/HAT. Los sobrenadantes de las colonias de hibridomas supervivientes se sometieron a un escrutinio basado en células mediante el uso de líneas celulares humanas que expresan la B7-H3 humana recombinante. Brevemente, se descongeló una línea celular humana que expresaba la B7-H3 humana y se dispuso directamente en placas de 96 pocillos (negras con fondo transparente para imágenes) a 50 000 células/pocillo en medio de cultivo y se incubó durante 2 días a 37 °C para alcanzar el 50 % de confluencia. Los sobrenadantes de hibridoma (50 µl/pocillo) se transfirieron a las placas respectivas y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se eliminó el medio de cada pocillo y se usó IgG-AF488 anti-ratón de cabra (Invitrogen, Núm. A11029, Grand Island, NY, EE. UU.) para la detección mediante el uso del Analizador InCell 2000 (GE). Los aciertos se expandieron y la unión se confirmó mediante FACS mediante el uso de una línea celular humana diferente o una línea celular de ratón que expresaba la B7-H3 humana y IgG-PE anti-ratón de cabra para la detección. La especificidad de la especie se determinó mediante el uso del formato ELISA de acuerdo con el siguiente procedimiento. Las placas de ELISA se recubrieron con proteínas B7-H3-ECD-humana Fc humano, B7-H3-ECD-his de cynomolgous o B7-H3-ECD-humana Fc de ratón durante la noche a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y se añadieron supos de hibridomas (100 µl) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron, se usó IgG-HRP anti-ratón de burro (Jackson Immunochemicals, Núm. 115-035-071, West Grove, PA, EE. UU.) para la detección, y se observaron las OD de unión a 650 nm.

Se subclonó una selección de aciertos mediante el uso de MoFlo (Beckman, Indianápolis, IN, EE. UU.) mediante el depósito de una única célula por pocillo en placas de cultivo celular de 96 pocillos para asegurar la clonalidad de la línea celular. Las colonias resultantes se cribaron para determinar su especificidad mediante FACS mediante el uso de líneas celulares de fibroblastos de ratón 3T12 que expresan la B7-H3 humana, B7-H3 de cynomolgous o B7-H3 de ratón. El isotipo de cada anticuerpo monoclonal se determinó mediante el uso del kit de isotipado monoclonal de ratón (Roche, Núm. 11-493-027-001, Indianápolis, IN, EE. UU.). Se subclonaron y purificaron clones de hibridoma que producían anticuerpos que mostraban una alta actividad de unión específica contra el antígeno B7-H3 humano y de cynomolgous y se purificaron (Tabla 2).

Tabla 2: Lista de anticuerpos anti-B7-H3 generados mediante el uso de la tecnología de hibridomas de ratón

| Nombre de clonación | Especie / Isotipo | Unión FACS (EC ₅₀ nM) | | |
|---------------------|-------------------|----------------------------------|----------------------|----------------|
| | | B7-H3 Humana | B7-H3 de Cynomolgous | B7-H3 de Ratón |
| Ab1 | IgG1/k de ratón | 2,10 | 1,79 | 299,0 |
| Ab2 | IgG1/k de ratón | 1,70 | 1,50 | 1,00 |
| Ab3 | IgG1/k de ratón | 1,66 | 1,42 | 0,94 |
| Ab4 | IgG2b/k de ratón | 4,06 | 3,10 | 1,75 |
| Ab5 | IgG1/k de ratón | 2,71 | 1,91 | 6,01 |
| Ab6 | IgG1/k de ratón | 1,59 | 1,53 | Sin unión |
| Ab7 | IgG1/k de ratón | 3,22 | 2,67 | 67,13 |
| Ab8 | IgG1/k de ratón | 3,83 | 8,63 | 193,0 |
| Ab9 | IgG1/k de ratón | 4,49 | 259,0 | 0,72 |
| Ab10 | IgG2b/k de ratón | 3,97 | 4,46 | 3,80 |
| Ab11 | IgG1/k de ratón | 23,40 | 2,03 | 568,60 |
| Ab12 | IgG1/k de ratón | 3,88 | 6,71 | 8,72 |
| Ab13 | IgG1/k de ratón | 1,94 | 4,12 | 25,80 |
| Ab14 | IgG1/k de ratón | 3,03 | 2,97 | 102,2 |
| Ab15 | IgG1/k de ratón | 5,37 | 6,52 | 4,61 |
| Ab16 | IgG1/k de ratón | 3,94 | 4,28 | 318,7 |
| Ab17 | IgG2b/k de ratón | 2,75 | 2,60 | 2,39 |
| Ab18 | IgG1/k de ratón | 5,98 | 6,49 | Sin unión |

Ejemplo 4: Caracterización *In Vitro* de Anticuerpos Monoclonales Anti-B7-H3 de Ratón.

La afinidad de unión de los anticuerpos monoclonales anti-B7-H3 purificados se determinó mediante resonancia superficial de plasmones. La tabla 3 muestra las constantes de velocidad de asociación (k_a), las constantes de velocidad de disociación (k_d) y las constantes de disociación de equilibrio (K_D) para una serie de anticuerpos monoclonales (mAb) anti-B7-H3 derivados de hibridoma de ratón que se unen a los ECD solubles de la B7-H3 humana y B7-H3 de cyno. La cinética de unión se derivó de las mediciones de SPR mediante el uso de un

instrumento Biacore T200 y un enfoque de captura de mAb (como se describió en los materiales y métodos más abajo).

Tabla 3: Cinética de Biacore de anticuerpos de hibridoma de ratón anti-B7-H3 que se unen a B7-H3 de humanos y de mono cynomolgus

| Nombre del Anticuerpo Murino | huB7-H3 | | | cynoB7-H3 | | |
|------------------------------|--|-------------|---------|--|-------------|---------|
| | k_a (1/MS) | k_d (1/s) | KD (M) | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | KD (M) |
| Ab17 | 5,4E+05 | 1,9E-05 | 3,4E-11 | 5,1E+05 | 1,0E-05 | 1,9E-11 |
| Ab18 | 2,1E+05 | 3,6E-05 | 1,7E-10 | 2,4E+05 | 2,9E-05 | 1,2E-10 |
| Ab15 | 8,0E+04 | 3,4E-05 | 4,3E-10 | 7,7E+04 | 7,0E-05 | 9,1E-10 |
| Ab4 | 6,9E+05 | 1,1E-03 | 1,6E-09 | 5,4E+05 | 9,6E-04 | 1,8E-09 |
| Ab8 | 5,8E+04 | 9,9E-05 | 1,7E-09 | 1,6E+05 | 2,6E-04 | 1,7E-09 |
| Ab10 | 4,1E+04 | 1,9E-04 | 4,6E-09 | 2,0E+05 | 4,2E-03 | 2,0E-08 |
| Ab12 | 3,8E+04 | 2,5E-04 | 6,7E-09 | 5,5E+04 | 1,0E-05 | 1,8E-10 |
| Ab5 | 1,3E+06 | 1,2E-02 | 9,2E-09 | 1,4E+06 | 2,8E-01 | 2,0E-07 |
| Ab14 | 1,1E+05 | 1,4E-03 | 1,3E-08 | 6,9E+05 | 3,0E-03 | 4,3E-09 |
| Ab9 | 6,6E+04 | 1,1E-03 | 1,7E-08 | Cinética pobre ajuste | | |
| Ab13 | 3,3E+05 | 5,8E-03 | 1,7E-08 | | | |
| Ab3 | 5,2E+05 | 1,0E-02 | 1,9E-08 | 3,8E+05 | 1,0E-02 | 2,6E-08 |
| Ab16 | 1,4E+05 | 3,2E-03 | 2,4E-08 | 7,5E+05 | 5,6E-03 | 7,5E-09 |
| Ab2 | 1,2E+05 | 2,9E-03 | 2,4E-08 | 2,3E+05 | 1,1E-02 | 5,0E-08 |
| Ab11 | 2,0E+04 | 8,9E-04 | 4,5E-08 | 2,7E+04 | 7,2E-05 | 2,6E-09 |
| Ab6 | 1,2E+04 | 1,0E-02 | 8,4E-07 | 2,8E+04 | 1,2E-02 | 4,1E-07 |
| Ab1 | sin unión observable poca unión observable | | | sin unión observable poca unión observable | | |
| Ab7 | | | | | | |

Se usaron ensayos de unión por parejas realizados en instrumentos Biacore T200 SPR para determinar el agrupamiento relativo de epítomos para los mAb anti-B7-H3 murinos como se describió en los métodos más abajo. La Figura 1 muestra una representación de la agrupación de epítomos, que describe la diversidad relativa del epítomo de la B7-H3 humana y el solapamiento para una serie de mAb anti-B7-H3 identificados en la presente descripción. Los grupos de epítomos se representan como óvalos individuales, algunos de los cuales se superponen entre sí. Los anticuerpos en diferentes grupos de epítomos pueden unirse a B7-H3 simultáneamente y probablemente se unan a diferentes epítomos, mientras que los anticuerpos dentro de un grupo de epítomo dado no pueden unirse a B7-H3 simultáneamente y probablemente se unan a epítomos superpuestos. La información de la agrupación se derivó de un ensayo de unión simultánea como se describió en materiales y métodos. Los grupos de Ab3, Ab4, Ab5, Ab11, Ab12 y Ab8 eran ambiguos.

Materiales y métodos: Cinéticas de unión

Se usaron instrumentos Biacore T200 SPR para medir la cinética de unión de la unión de la B7-H3 humana (analito) a varios mAb (ligandos). El formato de ensayo fue captura basada en Fc mediante anti-ratón inmovilizado (Fc) (Pierce 31170) o anti-humano inmovilizado (Fc) (Pierce 31125). Se empleó un protocolo de acoplamiento de amina estándar para inmovilizar los reactivos de captura mediante aminas primarias en la superficie de carboximetil (CM) dextrano de los chips sensores CM5 (Biacore); los anticuerpos de captura se acoplaron a un nivel de aproximadamente 5000 RU. Para las mediciones cinéticas de unión, el tampón de ensayo fue HBS-EP+ (Biacore): Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, polisorbato 20 al 0,05 %. Durante el ensayo, todas las mediciones se referenciaron solo contra la superficie de captura. Cada ciclo de ensayo constaba de las siguientes etapas: 1) Captura del ligando hasta aproximadamente 50 RU; 2) Inyección del analito sobre la superficie de referencia y de prueba, 240 μ L a 80 μ L/min, después de lo cual se controló la disociación durante 900 segundos a 80 μ L/min; 3) Regeneración de la superficie de captura con glicina a pH bajo. Para las determinaciones cinéticas, las inyecciones de analito fueron las series de dilución de 3 puntos, 9 veces de 900 nM, 100 nM y 11,11 nM, se incluyeron inyecciones de tampón solo para referencia secundaria. Los datos se procesaron y ajustaron a un modelo de unión 1:1 mediante el uso del software de evaluación Biacore T200 para determinar las constantes de velocidad de la cinética de unión, k_a (asociación) y k_d (disociación), y la constante de disociación del equilibrio (afinidad, K_D).

Materiales y métodos: Agrupación de epítomos

Se usaron ensayos de unión por parejas realizados en instrumentos Biacore T200 SPR para determinar el agrupamiento relativo de los epítomos para una serie de mAb anti-B7-H3. El formato de ensayo fue captura basada en Fc mediante anti-ratón inmovilizado (Fc) (Pierce 31170) o anti-humano inmovilizado (Fc) (Pierce 31125). Se empleó un protocolo de acoplamiento de amina estándar para inmovilizar los reactivos de captura mediante aminas primarias en la superficie de carboximetil (CM) dextrano de los chips sensores CM5 (Biacore); los anticuerpos de

captura se acoplaron a un nivel de aproximadamente 2000 RU. Las mediciones de agrupación de epítomos se realizaron a 12 °C (la temperatura baja permite agrupar información en los mAb de velocidad rápida), el tampón de ensayo fue HBS-EP+ (Biacore): Hepes 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, polisorbato 20 al 0,05 %. Cada ciclo de ensayo constaba de las siguientes etapas en un sistema de cuatro celdas de flujo: 1) se capturaron mAb de prueba separados en las celdas de flujo 2, 3 y 4 (la celda de flujo 1 era de referencia, sin mAb de prueba); 2) las 4 células de flujo se bloquearon luego mediante inyección con el mAb de control de isotipo o cóctel de mAb de isotipo a 50 µg/ml; 3) las 4 células de flujo se inyectaron luego con antígeno o solo con tampón (el tampón solo es para doble referencia, hecho para cada par de mAb individualmente); 4) las 4 células de flujo se inyectaron luego con el segundo mAb de prueba a 10 µg/ml; 5) las 4 células de flujo se regeneraron luego con glicina, pH 1,5. El ensayo se realizó para cada par de mAb de prueba en orientaciones recíprocas. Se evaluó la unión simultánea examinando la relación entre la respuesta de mAb de la segunda prueba y la respuesta de Ag (RU_{mAb2}/RU_{Ag}); si esta relación era igual o superior a 0,2, la interacción se puntuó como un aglutinante simultáneo. A partir de estos datos del ensayo de unión por pares, se construyó manualmente un diagrama de estilo "venn" para representar agrupaciones relativas de epítomos.

Ejemplo 5: Generación de Anticuerpos Quiméricos Anti-hB7-H3

Tras la identificación de anticuerpos de hibridoma anti-B7-H3 de ratón, se determinaron las regiones variables de la cadena pesada y ligera (VH y VL) correspondientes a los anticuerpos secretados a partir de células mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Las regiones variables murinas se expresaron en células huésped de mamíferos en el contexto de una región constante de inmunoglobulina humana para proporcionar los anticuerpos quiméricos. La Tabla 4 más abajo proporciona las secuencias de aminoácidos de la región variable para los hibridomas quimerizados de ratón.

Tabla 4: Secuencias de aminoácidos de la región variable de anticuerpos anti-B7-H3 de hibridomas de ratón

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|-------|-----------------------|---------------------------------|--|
| 1 | chAb2 | VH | | QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGY TFTSYWMHWVKQRPGGLEWIGMIHPD SGTTNYNEKFRSKATLTVDKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCAVYYGSTYWFYFD VWGTGTTVTVSS |
| 2 | chAb2 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 1 | GYTFTSYWMH |
| 3 | chAb2 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 1 | MIHPDSGTTNYNEKFRS |
| 4 | chAb2 | CDR-H3 | Residuos 99-109 de SEQ ID NO: 1 | YYGSTYWFYFDV |
| 5 | chAb2 | VL | | DVVMQTPLSLPVSLGDQAYISCRSSQ SLVHINGNTYLHWYRQKPGQSPKLLIY KVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVIYFCSSQSTHFPFTFGSGTK LEIK |
| 6 | chAb2 | CDR-L1 | Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 5 | RSSQSLVHINGNTYLH |
| 7 | chAb2 | CDR-L2 | Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 5 | KVSNRFS |
| 8 | chAb2 | CDR-L3 | Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 5 | SQSTHFPFT |
| 9 | chAb3 | VH | | QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGY TFSSYWMHWVKQRPGGLEWIGLIHPD SGSTNYNEMFKNKATLTVDRSSSTAYV QLSSLTSEDSAVYFCAGGGRLYFDYWG QGTTTLTVSS |
| 10 | chAb3 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 9 | GYTFSSYWMH |
| 11 | chAb3 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 9 | LIHPDSGSTNYNEMFKN |
| 12 | chAb3 | CDR-H3 | Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 9 | GGRLYFDY |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|--------|-----------------------|----------------------------------|---|
| 13 | chAb3 | VL | | DVVMTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQ SLVHSNGD TYLRWYLQKPGQSPKLLIY KVS NRFS GVPDR FSGSGSGTDFTLKIT RVEAEDLG VYFC SQSTHVPYT TFGGG TK LEIK |
| 14 | chAb3 | CDR-L1 | Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 13 | RSSQSLVHSNGD TYLR |
| 7 | chAb3 | CDR-L2 | Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 13 | KVS NRFS |
| 15 | chAb3 | CDR-L3 | Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 13 | SQSTHVPYT |
| 16 | chAb4 | VH | | QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGY SFTSYWMH WVKQRPQG GLEWIGMIHPN SGSN NYNEKFKS KATLTVDKSSNTAYM QLSSLTSEDSAVYYCARRLGLHFDYWG QGTTLTVSS |
| 17 | chAb4 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 16 | GYSFTSYWMH |
| 18 | chAb4 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 16 | MIHPNSGSN NYNEKFKS |
| 19 | chAb4 | CDR-H3 | Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 16 | RLGLHFDY |
| 20 | chAb4 | VL | | DIVMTQSQKFMSTPVGDRVSITCKASQ NVGTAVAWY QQKPGQSPKLLIY SASNR YT GVDPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSE DLADYFC QQYSSYPYT TFGGG TKLEIK |
| 21 | chAb4 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 20 | KASQNVGTAVA |
| 22 | chAb4 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 20 | SASNRYT |
| 23 | chAb4 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 20 | QQYSSYPYT |
| 24 | chAb18 | VH | | QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGY SFTSYTIH WVKQRPQG GLEWIGYINPN SRNTDYNQKFKD ETTLTADRSSSTAYM QLISLTSEDSAVYYCARY YSGSTPYWYF DV WGAGTTVTVSS |
| 25 | chAb18 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 24 | GYSFTSYTIH |
| 26 | chAb18 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 24 | YINPNSRNTDYNQKFKD |
| 27 | chAb18 | CDR-H3 | Residuos 99-110 de SEQ ID NO: 24 | YSGSTPYWYFDV |
| 28 | chAb18 | VL | | QIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCRASS SVSYMN WYQQKPGSSPKPWIY ATSNLA SGV PARFSVSVSGTSHSLTISRVEAED AATYYC QQWSSNPLT FGAGTKLELK |
| 29 | chAb18 | CDR-L1 | Residuos 24-33 de SEQ ID NO: 28 | RASSSVSYMN |
| 30 | chAb18 | CDR-L2 | Residuos 49-55 de SEQ ID NO: 28 | ATSNLAS |
| 31 | chAb18 | CDR-L3 | Residuos 88-96 de SEQ ID NO: 28 | QQWSSNPLT |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|--------|-----------------------|----------------------------------|--|
| 32 | chAb13 | VH | | DVQLQESGPD LVKPSQSLSLTCTVT GY SITSGYSWH WIRQFPGNKLEWMGY IHS SGSTNYNPSLKS RISINRDTSKNQFFL QLNSVTTEDTATYYCAGY DDYFEY WGQ GTTLTVSS |
| 33 | chAb13 | CDR-H1 | Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 32 | GYSITSGYSWH |
| 34 | chAb13 | CDR-H2 | Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 32 | YIHSSGSTNYNPSLKS |
| 35 | chAb13 | CDR-H3 | Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 32 | YDDYFEY |
| 36 | chAb13 | VL | | DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC KASQ NVGFNVA WYQQKPGQSPKALIY SASYR YSGVPDR FTGSGSGTDFTLTISNVQSE DLAEYFC QQYNSYPFT FGSGTKLEIK |
| 37 | chAb13 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 36 | KASQNVGFNVA |
| 38 | chAb13 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 36 | SASYRYS |
| 182 | chAb13 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 36 | QQYNSYPFT |
| 48 | chAb14 | VH | | EVKLVESGGGLVKPGGSLKLS CAASGF TFSSYGMS WVRQTPEKRLEWVAT ISGG GTNTYYPDSVEGRFT ISRDNAKNFLYL QMSSLRSEDTALYYCAR HYGSQ TMDYW GQGTSTVTVSS |
| 49 | chAb14 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 48 | GFTFSSYGMS |
| 50 | chAb14 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 48 | TISGGGTNTYYPDSVEG |
| 51 | chAb14 | CDR-H3 | Residuos 99-107 de SEQ ID NO: 48 | HYGSQ TMDY |
| 52 | chAb14 | VL | | DIQMTQSPASLSASVGETVTIT CR TSG NIHNYLT WYQQKQGKSPQLLVY NAKTL ADGVPSR FSGSGSGTQFSLKINSLQPE DFGSYYC QHFSIMWT FGGGTKLEIK |
| 53 | chAb14 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 52 | RTSGNIHNYLT |
| 54 | chAb14 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 52 | NAKTLAD |
| 55 | chAb14 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 52 | QHFSIMWT |
| 56 | chAb6 | VH | | QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKAT GY TF SRYWIEWVKQRPGHGLEWIG EILPG SGSTNYNEKFKG KATFTADTSSNTAYM QVSSLTSEDSAVHYCAR RGYGYVPYAL DYWGQGTSTVTVSS |
| 57 | chAb6 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 56 | GYTFSRYWIE |
| 58 | chAb6 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 56 | EILPGSGSTNYNEKFKG |
| 59 | chAb6 | CDR-H3 | Residuos 99-110 de SEQ ID NO: 56 | RGYGYVPYALDY |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|--------|-----------------------|-----------------------------------|--|
| 60 | chAb6 | VL | | EQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQ DISNSLNWYQQKPDGTVNLLIYYTSRL YSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEIK |
| 61 | chAb6 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 60 | RASQDISNSLN |
| 62 | chAb6 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 60 | YTSRLYS |
| 63 | chAb6 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 60 | QQGNTLPYT |
| 64 | chAb11 | VH | | EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGF TFTNYYSWVRQPPGKALEWLGFI RNK ANDYTTEYSASVKGRFTISRDNQSIL YLQMNTLRAEDSATYYCARESPGNPFA YWGQGLTVTVSA |
| 65 | chAb11 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 64 | GFTFTNYYS |
| 66 | chAb11 | CDR-H2 | Residuos 50-68 de SEQ ID NO: 64 | FIRNKANDYTTEYSASVKG |
| 67 | chAb11 | CDR-H3 | Residuos 101-109 de SEQ ID NO: 64 | ESPGNPFAY |
| 68 | chAb11 | VL | | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMTCKSSQ SLLNSGTQKNFLTWYQQKPGQPPLLI YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLT SSVQAEDLAVYFCQNDYIYPLTFGAGT KLELK |
| 69 | chAb11 | CDR-L1 | Residuos 24-40 de SEQ ID NO: 68 | KSSQSLLNSGTQKNFLT |
| 70 | chAb11 | CDR-L2 | Residuos 56-62 de SEQ ID NO: 68 | WASTRES |
| 71 | chAb11 | CDR-L3 | Residuos 95-103 de SEQ ID NO: 68 | QNDYIYPLT |
| 72 | chAb16 | VH | | EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGF DFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPD SSTINYTPSLKDKFII SRDNAKNTLYL QMSKVRSEDALYYCARPGFGNYIYAM DYWGQGTSTVTVSS |
| 73 | chAb16 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 72 | GFDFSRYWMS |
| 74 | chAb16 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 72 | EINPDSSTINYTPSLKD |
| 75 | chAb16 | CDR-H3 | Residuos 99-110 de SEQ ID NO: 72 | PGFGNYIYAMDY |
| 76 | chAb16 | VL | | DIQMTQTSSLSASLGDRVTINCRASQ DISNFLN WYQQKPDGTVKLLIYYTSRL YLGVPSPRFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPPTFGGGTKLEIK |
| 77 | chAb16 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 76 | RASQDISNFLN |
| 78 | chAb16 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 76 | YTSRLYL |
| 79 | chAb16 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 76 | QQGNTLPPT |

Ejemplo 6: Caracterización de la Unión de Anticuerpos Quiméricos Anti-B7-H3

Para generar anticuerpos quiméricos purificados, los vectores de expresión se transfectaron transitoriamente en cultivos de células en suspensión HEK293 6E en una proporción de 60 % a 40 % de construcción de cadena ligera a pesada. Se usó 1 mg/ml de polietilenimina (PEI) o 2,6 µl/ml de expifectamina para transfectar las células. Los sobrenadantes celulares se recolectaron después de cinco días en matraces con agitación, se centrifugaron para sedimentar las células y se filtraron a través de filtros de 0,22 µm para separar la IgG de los contaminantes del cultivo. Los sobrenadantes que contienen anticuerpos se purificaron en Akta Pure mediante el uso de proteína A mAb SelectSure. Las columnas se equilibraron en PBS pH 7,4, los sobrenadantes se pasaron a través de la columna y se realizó un lavado con PBS pH 7,4. Se eluyeron las IgG con ácido acético 0,1 M pH 3,5 y se recogieron en varias alícuotas. Las fracciones que contenían IgG se combinaron y se dializaron en PBS durante la noche a 4 °C. Los anticuerpos quiméricos anti-B7-H3 que se expresaron con éxito se caracterizaron por la capacidad de unirse a la línea celular humana NCI-H1650 de cáncer de pulmón de células no pequeñas que sobreexpresa B7-H3 (ATCC® No. CRL-5883) por FACS mediante el uso de los métodos descritos más abajo. La Tabla 5 resume las propiedades de unión de los anticuerpos quiméricos anti-B7-H3.

TABLA 5: Caracterización *in vitro* de los anticuerpos quiméricos B7-H3

| Nombre del Ab Quimérico | Isotipo | Hibridoma Parental | Unión FACS (EC ₅₀ nM) |
|-------------------------|----------|--------------------|----------------------------------|
| chAb2 | hulgG1/k | Ab2 | 0,10 |
| chAb3 | hulgG1/k | Ab3 | 0,61 |
| chAb4 | hulgG1/k | Ab4 | 0,56 |
| chAb18 | hulgG1/k | Ab18 | 1,14 |
| chAb13 | hulgG1/k | Ab13 | 1,53 |
| chAb11 | hulgG1/k | Ab11 | 1,12 |
| chAb6 | hulgG1/k | Ab6 | 0,33 |
| chAb16 | hulgG1/k | Ab16 | 0,27 |
| chAb14 | hulgG1/k | Ab14 | 0,81 |

Métodos de unión por FACS

Las células se recolectaron de matraces cuando tenían aproximadamente un 80 % de confluencia mediante el uso del tampón de disociación celular Gibco®. Las células se lavaron una vez en PBS/1 % de FBS (FACS buffer) después se resuspendieron en 2,5x10⁶ células/ml en tampón FACS. Se añadieron 100 µl de células/pocillo a una placa de 96 pocillos de fondo redondo. 10 µL de una concentración 10x de mAb/ADC (las concentraciones finales se indican en las cifras). Los pocillos se lavaron dos veces con tampón FACS y se resuspendieron en 50 µl de Ab secundario (AlexaFluor 488) diluido en tampón FACS. La placa se incubó a 4 °C durante una hora y se lavó dos veces con tampón FACS. Las células se resuspendieron en 100 µl de PBS/formaldehído al 1 % y se analizaron en un citómetro de flujo Becton Dickinson LSRII. Los datos se analizaron mediante el uso del software de análisis de citometría de flujo WinList.

Ejemplo 7: Caracterización de Anticuerpos Quiméricos anti-B7-H3 como Conjugados Anticuerpo-Fármaco para la Inhibición de Bcl-xL

Se conjugaron nueve anticuerpos quiméricos anti-B7-H3 con el sintón CZ inhibidor de Bcl-xL (Bcl-xLi) (Ejemplo 2.1) mediante el uso del Método de conjugación A descrito más abajo. Los ADC resultantes (anticuerpos anti-B7-H3 conjugados con el sintón CZ) se ensayaron para determinar su unión a la B7-H3 humana de la superficie celular mediante FACS (como se describió en el Ejemplo 6) y para determinar la citotoxicidad celular en líneas celulares que expresan B7-H3. De los nueve anticuerpos, tres anticuerpos (chAb2, chAb6 y chAb16) precipitaron después de la conjugación con el sintón CZ y mostraron una citotoxicidad débil en las células que expresan la B7-H3 humana. La Tabla 6 proporciona la unión a la superficie celular y la actividad de citotoxicidad de los ADC quimera anti-B7-H3 contra la célula de cáncer de mama HCC38 que expresa la B7-H3 humana.

TABLA 6: Caracterización *in vitro* de conjugados quiméricos-CZ B7-H3

| Nombre del ADC | Observación de conjugación | Unión mediante FACS de la B7-H3 Humana EC ₅₀ nM | Citotoxicidad (línea celular HCC38 IC ₅₀ nM) | Método de Conjugación | DAR por MS | % agr por SEC |
|----------------|----------------------------|--|---|-----------------------|------------|---------------|
| chAb2-CZ | Precipita | 2,60 | 4,77 | A | 1,0 | 5,9 |
| chAb3-CZ | Claro | 0,65 | 0,17 | A | 4,6 | 6,3 |
| chAb4-CZ | Claro | 0,54 | 0,26 | A | 1,4 | 5,7 |
| chAb18-CZ | Claro | 1,78 | 0,28 | A | 2,3 | 4,3 |
| chAb13-CZ | Claro | 1,49 | 0,18 | A | 3,8 | 8,3 |
| chAb11-CZ | Claro | 1,12 | 2,34 | A | 3,2 | 5,6 |
| chAb6-CZ | Precipita | 0,56 | 80,98 | A | 1,3 | 0,5 |
| chAb16-CZ | Precipita | 0,62 | 21,89 | A | 0,9 | 2,3 |
| chAb14-CZ | Claro | 0,50 | 2,01 | A | 1,4 | 1,9 |

Materiales y métodos: conjugación de los ADC inhibidores de Bcl-xL

Los ADC se sintetizaron mediante el uso de uno de los métodos descritos más abajo. Los ADC ilustrativos se sintetizaron mediante el uso de uno de los nueve métodos ilustrativos, descritos más abajo.

Método A. Se añadió una solución de Bond-Breaker™ tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 0,017 ml) a una solución del anticuerpo (10 mg/ml, 1 ml) previamente calentada a 37 °C. La mezcla de reacción se mantuvo a 37 °C durante 1 hora. La solución del anticuerpo reducido se añadió a una solución del sintón (3,3 mM, 0,160 ml en DMSO) y se mezcló suavemente durante 30 minutos. La solución de reacción se cargó en una columna de desalinización (PD10, se lavó con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco [DPBS] 3x antes de su uso), seguido de DPBS (3 ml). La solución de ADC purificada se filtró a través de un filtro de jeringa de 13 mm de baja unión a proteínas de 0,2 micrómetros y se almacenó a 4 °C.

Método B. Se añadió una solución de Bond-Breaker™ tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 0,017 ml) a la solución del anticuerpo (10 mg/ml, 1 ml) previamente calentada a 37 °C. La mezcla de reacción se mantuvo a 37 °C durante 1 hora. La solución del anticuerpo reducido se ajustó a pH = 8 mediante la adición de tampón bórico (0,05 ml, 0,5 M, pH 8), se añadió a una solución del sintón (3,3 mM, 0,160 ml en DMSO) y se mezcló suavemente durante 4 horas. La solución de reacción se cargó en una columna de desalinización (PD10, se lavó con DPBS 3x antes de su uso), seguido de DPBS (1,6 ml) y se eluyó con DPBS adicional (3 ml). La solución de ADC purificada se filtró a través de un filtro de jeringa de 13 mm de baja unión a proteínas de 0,2 micrómetros y se almacenó a 4 °C.

Método C. Las conjugaciones se realizaron mediante el uso de un sistema robótico de manipulación de líquidos PerkinElmer Janus (pieza AJL8M01) equipado con una tecnología de dispensación ModuLar (MDT) de 1235/96 puntas, cabezal desechable (pieza 70243540) que contiene un brazo de agarre (pieza 7400358) y un brazo de pipeteado Varispan de 8 puntas (pieza 7002357) en una plataforma expandida. El sistema PerkinElmer Janus se controló mediante el uso del software WinPREP versión 4.8.3.315.

Se humedeció previamente una placa de filtro Pall 5052 con 100 µl de 1x DPBS mediante el uso de MDT. Se aplicó vacío a la placa de filtro durante 10 segundos y fue seguido por una ventilación de 5 segundos para eliminar el DPBS de la placa de filtro. Se vertió una suspensión al 50 % de la resina de Proteína A (GE MabSelect Sure) en DPBS en un depósito de 8 pocillos equipado con una bola magnética, y la resina se mezcló pasando un imán móvil por debajo de la placa del depósito. El brazo Varispan de 8 puntas, equipado con puntas conductoras de 1 ml, se usó para aspirar la resina (250 µL) y transferirla a una placa de filtro de 96 pocillos. Se aplicó vacío durante 1 ciclo para eliminar la mayor parte del tampón. Mediante el uso de MDT, se aspiraron 150 µl de 1xPBS y se dispensaron a la placa de filtro de 96 pocillos que contenía la resina. Se aplicó vacío, eliminando el tampón de la resina. El ciclo de enjuague/vacío se repitió 3 veces. Se montó una placa de recogida de 96 pocillos de 2 ml en la plataforma Janus y el MDT transfirió 450 µl de 5x DPBS a la placa de recogida para su uso posterior. Se preparó el anticuerpo reducido (2 mg) como una solución en (200 µl) de DPBS como se describió anteriormente para las Condiciones A y se cargó previamente en una placa de 96 pocillos. Las soluciones de anticuerpo reducido se transfirieron a los pocillos de la placa de filtro que contenían la resina y la mezcla se mezcló con el MDT mediante aspiración/dispensación repetida de un volumen de 100 µl dentro del pocillo durante 45 segundos por ciclo. El ciclo de aspiración/dispensación se repitió un total de 5 veces en el transcurso de 5 minutos. Se aplicó vacío a la placa de filtro durante 2 ciclos, eliminando así el exceso de anticuerpo. Las puntas de MDT se enjuagaron con agua durante 5 ciclos (200 µl, 1 ml

de volumen total). El MDT aspiró y dispensó 150 µl de DPBS a los pocillos de la placa del filtro que contenían el anticuerpo unido a la resina y se aplicó vacío durante dos ciclos. La secuencia de lavado y vacío se repitió dos veces más. Después del último ciclo de vacío, se dispensaron 100 µl de 1x DPBS a los pocillos que contenían el anticuerpo unido a resina. A continuación, el MDT recogió 30 l de cada una de las soluciones de dimetilsulfóxido 3,3 mM de los sintones sembrados en un formato de 96 pocillos y los distribuyó en la placa de filtro que contenía el anticuerpo unido a resina en DPBS. Los pocillos que contienen la mezcla de conjugación se mezclaron con el MDT mediante aspiración/dispensación repetidas de un volumen de 100 µl dentro del pocillo durante 45 segundos por ciclo. La secuencia de aspiración/dispensación se repitió un total de 5 veces en el transcurso de 5 minutos. Se aplicó vacío durante 2 ciclos para eliminar el exceso del sintón y eliminarlo. Las puntas de MDT se enjuagaron con agua durante 5 ciclos (200 µl, 1 ml de volumen total). El MDT aspiró y dispensó DPBS (150 µl) a la mezcla de conjugación y se aplicó vacío durante dos ciclos. La secuencia de lavado y vacío se repitió dos veces más. El agarre MDT luego movió la placa del filtro y el collar a una estación de retención. El MDT colocó la placa de recolección de 2 ml que contenía 450 µl de DPBS 10x dentro del colector de vacío. El MDT reensambló el colector de vacío colocando la placa del filtro y el collar. Las puntas de MDT se enjuagaron con agua durante 5 ciclos (200 µl, 1 ml de volumen total). El MDT aspiró y dispensó 100 µl de Tampón de elución 3,75 de IgG (Pierce) a la mezcla de conjugación. Después de un minuto, se aplicó vacío durante 2 ciclos y el eluyente se capturó en la placa receptora que contenía 450 µl de 5x DPBS. La secuencia de aspiración/dispensación se repitió 3 veces más para administrar muestras de ADC con concentraciones en el intervalo de 1,5-2,5 mg/ml a pH 7,4 en DPBS.

Método D. Las conjugaciones se realizaron mediante el uso de un sistema robótico de manipulación de líquidos PerkinElmer Janus (pieza AJL8M01) equipado con una tecnología de dispensación ModuLar (MDT) de 1235/96 puntas, cabezal desechable (pieza 70243540) que contiene un brazo de agarre (pieza 7400358) y un brazo de pipeteado Varispan de 8 puntas (pieza 7002357) en una plataforma expandida. El sistema PerkinElmer Janus se controló mediante el uso del software WinPREP versión 4.8.3.315.

Se humedeció previamente una placa de filtro Pall 5052 con 100 µl de 1x DPBS mediante el uso de MDT. Se aplicó vacío a la placa de filtro durante 10 segundos y fue seguido por una ventilación de 5 segundos para eliminar el DPBS de la placa de filtro. Se vertió una suspensión al 50 % de la resina de Proteína A (GE MabSelect Sure) en DPBS en un depósito de 8 pocillos equipado con una bola magnética, y la resina se mezcló pasando un imán móvil por debajo de la placa del depósito. El brazo Varispan de 8 puntas, equipado con puntas conductoras de 1 ml, se usó para aspirar la resina (250 µL) y transferirla a una placa de filtro de 96 pocillos. Se aplicó vacío a la placa de filtro durante 2 ciclos para eliminar la mayor parte del tampón. El MDT aspiró y dispensó 150 µl de DPBS a los pocillos de la placa del filtro que contenían la resina. La secuencia de lavado y vacío se repitió dos veces más. Se montó una placa de recogida de 96 pocillos de 2 ml en la plataforma Janus y el MDT transfirió 450 µl de 5x DPBS a la placa de recogida para su uso posterior. Se preparó el anticuerpo reducido (2 mg) como una solución en (200 µl) de DPBS como se describió anteriormente para las Condiciones A y se dispensó en la placa de 96 pocillos. A continuación, el MDT recogió 30 µl de cada una de las soluciones de dimetilsulfóxido 3,3 mM de los sintones colocados en placas en un formato de 96 pocillos y las distribuyó en la placa cargada con anticuerpo reducido en DPBS. La mezcla se mezcló con el MDT mediante aspiración/dispensación repetida dos veces de un volumen de 100 µl dentro del pocillo. Después de cinco minutos, la mezcla de reacción de conjugación (230 µl) se transfirió a la placa de filtro de 96 pocillos que contenía la resina. Los pocillos que contenían la mezcla de conjugación y la resina se mezclaron con el MDT mediante aspiración/dispensación repetidas de un volumen de 100 µl dentro del pocillo durante 45 segundos por ciclo. La secuencia de aspiración/dispensación se repitió un total de 5 veces en el transcurso de 5 minutos. Se aplicó un vacío durante 2 ciclos para eliminar el exceso de sintón y proteína al desecho. Las puntas de MDT se enjuagaron con agua durante 5 ciclos (200 µl, 1 ml de volumen total). El MDT aspiró y dispensó DPBS (150 µl) a la mezcla de conjugación y se aplicó vacío durante dos ciclos. La secuencia de lavado y vacío se repitió dos veces más. El agarre MDT luego movió la placa del filtro y el collar a una estación de retención. El MDT colocó la placa de recolección de 2 ml que contenía 450 µl de DPBS 10x dentro del colector de vacío. El MDT reensambló el colector de vacío colocando la placa del filtro y el collar. Las puntas de MDT se enjuagaron con agua durante 5 ciclos (200 µl, 1 ml de volumen total). El MDT aspiró y dispensó 100 µl de Tampón de Elución 3,75 (P) de IgG a la mezcla de conjugación. Después de un minuto, se aplicó vacío durante 2 ciclos y el eluyente se capturó en la placa receptora que contenía 450 µl de 5x DPBS. La secuencia de aspiración/dispensación se repitió 3 veces más para administrar muestras de ADC con concentraciones en el intervalo de 1,5-2,5 mg/ml a pH 7,4 en DPBS.

Método E. Se añadió una solución de Bond-Breaker™ tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 0,017 ml) a la solución del anticuerpo (10 mg/ml, 1 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 75 minutos. La solución del anticuerpo reducido se enfrió a temperatura ambiente y se añadió a una solución del sintón (10 mM, 0,040 ml en DMSO) seguido de la adición de tampón bórico (0,1 ml, 1 M, pH 8). La solución de reacción se dejó reposar durante 3 días a temperatura ambiente, se cargó en una columna de desalinización (PD10, se lavó con DPBS 3x5 ml antes de su uso), seguido de DPBS (1,6 ml) y se eluyó con DPBS adicional (3 ml). La solución de ADC purificada se filtró a través de un filtro de jeringa de 13 mm de baja unión a proteínas de 0,2 micrómetros y se almacenó a 4 °C.

Método F. Las conjugaciones se realizaron mediante el uso de un sistema robótico de manipulación de líquidos Tecan Freedom Evo. La solución del anticuerpo (10 mg/ml) se calentó previamente a 37 °C y se dividió en alícuotas en una placa caliente de 96 pocillos profundos en cantidades de 3 mg por pocillo (0,3 ml) y se mantuvo a 37 °C. Se

añadió una solución de Bond-Breaker™ tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP) (1 mM, 0,051 ml/pocillo) a los anticuerpos y la mezcla de reacción se mantuvo a 37 °C durante 75 minutos. La solución del anticuerpo reducido se transfirió a una placa de 96 pocillos profundos sin calentar. Se añadieron las correspondientes soluciones de sintones (5 mM, 0,024 ml en DMSO) a los pocillos con anticuerpos reducidos y se trataron durante 15 minutos. Las soluciones de reacción se cargaron en una plataforma (8 x 12) de columnas de desalinización (NAP5, se lavaron con DPBS 4x antes de su uso), seguido de DPBS (0,3 ml) y se eluyeron con DPBS adicional (0,8 ml). Las soluciones de ADC purificadas se dividieron en alícuotas adicionales para análisis y se almacenaron a 4 °C.

Método G. Las conjugaciones se realizaron mediante el uso de un sistema robótico de manipulación de líquidos Tecan Freedom Evo. La solución del anticuerpo (10 mg/ml) se calentó previamente a 37 °C y se dividió en alícuotas en una placa caliente de 96 pocillos profundos en cantidades de 3 mg por pocillo (0,3 ml) y se mantuvo a 37 °C. Se añadió una solución de Bond-Breaker™ tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (1 mM, 0,051 ml/pocillo) a los anticuerpos y la mezcla de reacción se mantuvo a 37 °C durante 75 minutos. Las soluciones del anticuerpo reducido se transfirieron a una placa de 96 pocillos profundos sin calentar. Se añadieron las correspondientes soluciones de sintones (5 mM, 0,024 ml/pocillo en DMSO) a los pocillos con anticuerpos reducidos seguido de la adición de tampón bórico (pH = 8, 0,03 ml/pocillo) y se trataron durante 3 días. Las soluciones de reacción se cargaron en una plataforma (8 x 12) de columnas de desalinización (NAP5, se lavaron con DPBS 4x antes de su uso), seguido de DPBS (0,3 ml) y se eluyeron con DPBS adicional (0,8 ml). Las soluciones de ADC purificadas se dividieron en alícuotas adicionales para análisis y se almacenaron a 4 °C.

Método H. Se añadió una solución de Bond-Breaker™ tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) (10 mM, 0,17 ml) a la solución de anticuerpo (10 mg/ml, 10 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 75 minutos. Se añadió la solución del sintón (10 mM, 0,40 ml en DMSO) a una solución de anticuerpo reducido enfriada a temperatura ambiente. La solución de reacción se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución de ADC se trató con una solución saturada de sulfato de amonio (~2 - 2,5 ml) hasta que se formó una solución ligeramente turbia. Esta solución se cargó en una columna de butil sefarosa (5 ml de butil sefarosa) equilibrada con la fase B al 30 % en la fase A (fase A: sulfato de amonio 1,5 M, fosfato 25 mM; fase B: fosfato 25 mM, isopropanol al 25 % v/v). Las fracciones individuales con DAR2 (también denominado "E2") y DAR4 (también denominado "E4") eluyeron al aplicar el gradiente A/B hasta el 75 % de la fase B. Cada solución de ADC se concentró y se cambió el tampón mediante el uso de concentradores centrífugos o TFF para escalas más grandes. Las soluciones de ADC purificadas se filtraron a través de un filtro de jeringa de 13 mm de baja unión a proteínas de 0,2 micrómetros y se almacenaron a 4 °C.

Método I. Se añadió una solución de Bond-Breaker™ tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (10 mM, 0,17 ml) a la solución de anticuerpo (10 mg/ml, 10 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se calentó a 37 °C durante 75 minutos. Se añadió la solución del sintón (10 mM, 0,40 ml en DMSO) a una solución de anticuerpo reducido enfriada a temperatura ambiente. La solución de reacción se dejó reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución de ADC se trató con una solución saturada de sulfato de amonio (~2 - 2,5 ml) hasta que se formó una solución ligeramente turbia. Esta solución se cargó en una columna de butil sefarosa (5 ml de butil sefarosa) equilibrada con 30 % de fase B en la Fase A (fase A: sulfato de amonio 1,5 M, fosfato 25 mM; fase B: fosfato 25 mM, isopropanol al 25 % v/v). Las fracciones individuales con DAR2 (también denominado "E2") y DAR 4 (también denominado "E4") eluyeron al aplicar un gradiente A/B hasta el 75 % de la fase B. Cada solución de ADC se concentró y se cambió el tampón mediante el uso de concentradores de centrifuga o TFF para escalas mayores. Las soluciones de ADC se trataron con tampón bórico (0,1 ml, 1 M, pH 8). La solución de reacción se dejó reposar durante 3 días a temperatura ambiente, luego se cargó en una columna de desalinización (PD10, se lavó con DPBS 3x5 ml antes de usar), seguido de DPBS (1,6 ml) y se eluyó con DPBS adicional (3 ml). La solución de ADC purificada se filtró a través de un filtro de jeringa de 13 mm de baja unión a proteínas de 0,2 micrómetros y se almacenó a 4 °C.

DAR y agregación de ADC

El DAR y el por ciento de agregación de ADC sintetizados se determinaron mediante LC-MS y cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), respectivamente.

Metodología general de LC-MS

El análisis por LC-MS se realizó mediante el uso de un sistema HPLC Agilent 1100 conectado a un espectrómetro de masas Agilent LC/MSD TOF 6220 ESI. El ADC se redujo con una solución Bond-Breaker® TCEP de 5 mM (concentración final) (Thermo Scientific, Rockford, IL), se cargó en un cartucho de desalinización Protein Microtrap (Michrom Bioresources, Auburn, CA) y se eluyó con un gradiente del 10 % de B al 75 % B en 0,2 minutos a temperatura ambiente. La fase móvil A era H₂O con ácido fórmico al 0,1 % (FA), la fase móvil B era acetonitrilo con 0,1 % de FA, y el régimen de flujo fue de 0,2 ml/min. Los espectros de masas del tiempo de vuelo de electropulverización de las cadenas ligeras y pesadas que eluyen conjuntamente se adquirieron mediante el uso del software de adquisición Agilent MassHunter™. La intensidad extraída frente al espectro m/z se deconvolucionó mediante el uso de la característica de máxima entropía del software MassHunter para determinar la masa de cada fragmento de anticuerpo reducido. El DAR se calculó a partir del espectro deconvolucionado sumando las

intensidades de los picos desnudos y modificados para la cadena ligera y la cadena pesada, normalizados multiplicando la intensidad por el número de fármacos unidos. Las intensidades sumadas normalizadas se dividieron por la suma de las intensidades, y los resultados de la suma de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas produjeron un valor DAR medio final para el ADC completo.

La hidrólisis de tiosuccinimida de un bioconjugado puede controlarse mediante espectrometría de masas por electropulverización, ya que la adición de agua al conjugado da como resultado un aumento de 18 Dalton en el peso molecular observable del conjugado. Cuando se prepara un conjugado reduciendo completamente los disulfuros entre cadenas de un anticuerpo IgG1 humano y conjugando el derivado de maleimida con cada una de las cisteínas resultantes, cada cadena ligera del anticuerpo contendrá una única modificación de maleimida y cada cadena pesada contendrá tres modificaciones de maleimida como se describió en la Figura 2. Tras la hidrólisis completa de las tiosuccinimidas resultantes, la masa de la cadena ligera aumentará, por tanto, en 18 Dalton, mientras que la masa de cada cadena pesada aumentará en 54 Dalton. Esto se ilustra en la Figura 5 con la conjugación y la hidrólisis subsiguiente de un conector de fármaco maleimida ilustrativo (sintón TX, peso molecular 1736 Da) al anticuerpo huAb13v1 completamente reducido.

Metodología general de la cromatografía de exclusión por tamaño

La cromatografía de exclusión por tamaño se realizó mediante el uso de una columna Shodex KW802.5 en fosfato potásico 0,2 M pH 6,2 con cloruro potásico 0,25 mM e IPA al 15 % a un régimen de flujo de 0,75 ml/min. La absorbancia del área del pico a 280 nm se determinó para cada uno de los eluyentes monoméricos y de alto peso molecular mediante la integración del área bajo la curva. El % de la fracción agregada de la muestra de conjugado se determinó dividiendo la absorbancia del área del pico a 280 nm para el eluyente de alto peso molecular por la suma de las absorbancias del área del pico a 280 nm del eluyente de alto peso molecular y los eluyentes monoméricos multiplicada por 100 %.

Métodos de ensayo de viabilidad celular *in vitro*

Las líneas de células tumorales HCC38 (cáncer de mama), NCI-H1650 (NSCLC) y NCI-H847 (línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos mediante el uso del medio de crecimiento recomendado durante la noche a una densidad de 5×10^3 (HCC38) o 20×10^3 (NCI-H847) o 40×10^3 (NCI-H1650) por pocillo. Al día siguiente, los tratamientos se agregaron en medio fresco para triplicar los pocillos. La viabilidad celular se determinó 5 días después mediante el uso del kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega), como se indica en el protocolo del fabricante. La viabilidad celular se evaluó como por ciento de células control no tratadas.

Ejemplo 8: Eficacia *in vivo* de los conjugados Anticuerpo-Fármaco Anti-B7-H3

De los nueve anticuerpos quiméricos probados *in vitro* conjugados con los sintones CZ, cuatro mostraron citotoxicidad subnanomolar (Tabla 6). chAb3-CZ, chAb18-CZ y chAb13-CZ alcanzaron DAR de 2,6 a 4,2 (véase la Tabla 7) y se evaluó la actividad antitumoral en un xenoinjerto de ratón de línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas modelo NCI-H146, de origen humano, mediante el uso de los métodos que se describen más abajo. El anticuerpo MSL109 (un anticuerpo IgG1 que se une a la glicoproteína H del citomegalovirus (CMV)) se usó como control, tanto como anticuerpo desnudo como ADC (conjugado al mismo sintón (CZ) que los anticuerpos chAb3, chAb18 y chAb13). MSL109 es un control no dirigido a un isotipo coincidente. Los métodos de este ensayo de xenoinjerto se describen más abajo. Los resultados se presentan en la Tabla 7. Los resultados muestran que cada uno de los ADC anti-B7-H3 inhibidores de Bcl-xL fueron capaces de inhibir significativamente el crecimiento tumoral en relación con el control de anticuerpo desnudo (MSL109) o el control de ADC de Bcl-xL no específico para la diana (MSL109-CZ).

Tabla 7: Eficacia *in vivo* del anticuerpo quimérico anti-B7-H3 como conjugados de fármaco Bcl-xL

| ADC | Método de Conjugación | DAR | Dosis ^[a] /vía/régimen | Número de ratones | TGI _{máx} (%) | TGD (%) |
|-----------|-----------------------|-----|-----------------------------------|-------------------|------------------------|---------|
| MSL109 | - | - | 10 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 0 | 0 |
| MSL109-CZ | A | 4,2 | 10 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 34 | 10 |
| chAb3-CZ | A | 3,5 | 10 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 87 | 109 |
| chAb18-CZ | A | 2,6 | 10 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 90 | 100 |
| chAb13-CZ | A | 3,7 | 10 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 81 | 104 |

^[a] la dosis se administra en mg/kg/día

Evaluación de la eficacia en métodos de modelos de xenoinjerto

Las células NCI-H146, las células NCI-1650 y las células EBC-1 se obtuvieron de la American Type Culture

Collection (ATCC, Manassas, VA). Las células se cultivaron como monocapas en medio de cultivo RPMI-1640 (NCI-H146, NCI-H1650) o MEM (EBC-1) (Invitrogen, Carlsbad, CA) que se suplementaron con suero fetal bovino al 10 % (FBS, Hyclone, Logan, UT). Para generar los xenoinjertos, 5×10^6 células viables se inocularon subcutáneamente en el flanco derecho de ratones hembra SCID/bg inmunodeficientes (Charles River Laboratories, Wilmington, MA), respectivamente. El volumen de inyección fue de 0,2 ml y estaba compuesto por una mezcla 1:1 de S MEM y Matrigel (BD, Franklin Lakes, NJ). Los tumores se equipararon en tamaño a aproximadamente 200 mm³. Los anticuerpos y conjugados se formularon en cloruro de sodio al 0,9 % para inyección y se inyectaron por vía intraperitoneal. El volumen de inyección no superó los 200 µl. La terapia comenzó dentro de las 24 horas posteriores al ajuste de tamaño de los tumores. Los ratones pesaron aproximadamente 22 g al comienzo de la terapia. El volumen del tumor se estimó de dos a tres veces por semana. Las mediciones de la longitud (L) y el ancho (W) se tomaron del tumor a través de calibrador electrónico y el volumen se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación: $V = L \times W^2/2$. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen del tumor alcanzó los 3000 mm³ o se produjeron ulceraciones cutáneas. Se alojaron ocho ratones por jaula. Comida y agua estaban disponibles a voluntad. Los ratones se aclimataron a las instalaciones de los animales durante un período de al menos una semana antes del comienzo de los experimentos. Los animales se probaron en la fase de luz de un programa de 12 horas de luz: 12 horas de oscuridad (luces encendidas a las 06:00 horas). Como se describió anteriormente, el anticuerpo control de IgG humano (MSL109) se usó como agente de control negativo.

Para referirse a la eficacia de los agentes terapéuticos, se usaron los parámetros de amplitud (TGI_{\max}), durabilidad (TGD) de la respuesta terapéutica. TGI_{\max} es la inhibición máxima del crecimiento tumoral durante el experimento. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula por $100 \times (1 - T_v/C_v)$ donde T_v y C_v son los volúmenes medios del tumor de los grupos tratados y control, respectivamente. El TGD o retraso del crecimiento tumoral es el tiempo prolongado de un tumor tratado necesario para alcanzar un volumen de 1 cm³ en relación con el grupo control. TGD se calcula por $100 \times (T_t/C_t - 1)$ donde T_t y C_t son los períodos de tiempo medio para alcanzar 1 cm³ de los grupos tratados y control, respectivamente.

Ejemplo 9: Humanización del Anticuerpo chAb18 Anti-B7-H3

Se seleccionó el anticuerpo quimérico anti-B7-H3 chAb18 para la humanización en base a sus características de unión y propiedades favorables como ADC, incluidas sus propiedades cuando se conjuga con un inhibidor de Bcl-xL (descrito anteriormente como conjugado CZ ilustrativo).

Se generaron anticuerpos humanizados en base a las secuencias de las CDR variables pesadas (VH) y variables ligeras (VL) de chAb18. Específicamente, se seleccionaron secuencias de la línea germinal humana para construir anticuerpos chAb18 humanizados injertados con CDR, donde los dominios CDR de las cadenas VH y VL se injertaron en diferentes secuencias aceptoras de las cadenas pesadas y ligeras humanas. En base a las alineaciones con las secuencias VH y VL del anticuerpo monoclonal chAb18, se seleccionaron las siguientes secuencias humanas como aceptoras:

- IGHV1-69*06 e IGHJ6*01 para construir las secuencias aceptoras de la cadena pesada
- IGKV1-9*01 e IGKJ2*01 para construir las secuencias aceptoras de la cadena ligera
- IGKV6-21*01 e IGKJ2*01 como aceptor de respaldo para la construcción de las cadenas ligeras

Por tanto, las CDR VH y VL de chAb18 se injertaron en dichas secuencias aceptoras.

Para generar anticuerpos humanizados, se identificaron las retromutaciones marco y se introdujeron en las secuencias de anticuerpos injertadas con CDR mediante síntesis *de novo* del dominio variable o cebadores de oligonucleótidos mutagénicos y reacciones en cadena de la polimerasa, o ambos mediante métodos bien conocidos en la técnica. Se construyeron diferentes combinaciones de retromutaciones y otras mutaciones para cada uno de los injertos de CDR como se describió más abajo. Los números de residuos de estas mutaciones se basan en el sistema de numeración de Kabat.

Para las cadenas pesadas huAb 18VH.1, uno o más de los siguientes residuos de la interfaz de Vernier y VH/VL se volvieron a mutar como sigue: L46P, L47W, G64V, F71H. Las mutaciones adicionales incluyen las siguientes: Q1E, N60A, K64Q, D65G. Para las cadenas ligeras huAb18VL.1, uno o más de los siguientes residuos de la interfaz de Vernier y VH/VL se volvieron a mutar como sigue: A43S, L46P, L47W, G64V, G66V, F71H. Para las cadenas ligeras huAb18VL.2, uno o más de los siguientes residuos de la interfaz Vernier y VH/VL se volvieron a mutar como sigue: L46P, L47W, K49Y, G64V, G66V, F71H.

La región variable y las secuencias de aminoácidos de la CDR de los anticuerpos humanizados se describen en la Tabla 8 más abajo.

TABLA 8: Secuencias de aminoácidos de VH y VL de las versiones humanizadas de chAb18

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|-------------|-----------------------|--------------------------------------|---|
| 116 | huAb18VH.1 | VH | | EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKAS GYSFTSYTIH WVRQAPGQGLEWMGY INPNSRNTDYNQKFKD RVTITADKS TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARYS GSTPYWYFDV WGQGT TTVTVSS |
| 25 | huAb18VH.1 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 116 | GYSFTSYTIH |
| 26 | huAb18VH.1 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 116 | YINPNSRNTDYNQKFKD |
| 27 | huAb18VH.1 | CDR-H3 | Residuos 99-110 de SEQ ID NO: 116 | YSGSTPYWYFDV |
| 117 | huAb18VH.1a | VH | | EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKAS GYSFTSYTIH WVRQAPGQGLEWIGY INPNSRNTDYNQKFKD R T TLTADRS TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARYS GSTPYWYFDV WGQGT TTVTVSS |
| 25 | huAb18VH.1a | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 117 | GYSFTSYTIH |
| 26 | huAb18VH.1a | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 117 | YINPNSRNTDYNQKFKD |
| 27 | huAb18VH.1a | CDR-H3 | Residuos 99-110 de SEQ ID NO: 117 | YSGSTPYWYFDV |
| 118 | huAb18VH.1b | VH | | EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKAS GYSFTSYTIH WVRQAPGQGLEWMGY INPNSRNTDYAQKFQG RVTTLTADKS TSTAYMELSSLRSED TAVYYCARYS GSTPYWYFDV WGQGT TTVTVSS |
| 25 | huAb18VH.1b | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 118 | GYSFTSYTIH |
| 119 | huAb18VH.1b | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 118 | YINPNSRNTDYAQKFQG |
| 27 | huAb18VH.1b | CDR-H3 | Residuos 99-110 de SEQ ID NO: 118 | YSGSTPYWYFDV |
| 120 | huAb18VL.1 | VL | | DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRA SSSVSYMN WYQQKPGKAPKLLIYAT SNLAS GVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPEDFATYYC QQWSSNPL TFGQG TKLEIK |
| 29 | huAb18VL.1 | CDR-L1 | Residuos 24-33 de SEQ ID NO: 120 | RASSSVSYMN |
| 30 | huAb18VL.1 | CDR-L2 | Residuos 49-55 de SEQ ID NO: 120 | ATSNLAS |
| 31 | huAb18VL.1 | CDR-L3 | Residuos 88-96 de SEQ ID NO: 120 | QQWSSNPLT |
| 121 | huAb18VL.1a | VL | | DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRA SSSVSYMN WYQQKPGKSPKPIYAT SNLAS GVPSRFSVSVSGTEHTLTIS SLQPEDFATYYC QQWSSNPL TFGQG TKLEIK |
| 29 | huAb18VL.2a | CDR-L1 | Residuos 24-33 de SEQ ID NO: 124 | RASSSVSYMN |
| 30 | huAb18VL.2a | CDR-L2 | Residuos 49-55 de SEQ ID NO: 124 | ATSNLAS |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|-------------|-----------------------|----------------------------------|---|
| 31 | huAb18VL.1a | CDR-L3 | Residuos 88-96 de SEQ ID NO: 121 | QQWSSNPLT |
| 122 | huAb18VL.1b | VL | | DIQLTQSPSFLSASVGDRTTITCRA SSSVSYMN WYQQKPGKAPKRWIYAT SNLAS GVPSRFSVSGSGTEHTLTIS SLQPEDFATYYC QQWSSNPLT FGQG TKLEIK |
| 29 | huAb18VL.1b | CDR-L1 | Residuos 24-33 de SEQ ID NO: 122 | RASSSVSYMN |
| 30 | huAb18VL.1b | CDR-L2 | Residuos 49-55 de SEQ ID NO: 122 | ATSNLAS |
| 31 | huAb18VL.1b | CDR-L3 | Residuos 88-96 de SEQ ID NO: 122 | QQWSSNPLT |
| 123 | huAb18VL.2 | VL | | EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRA SSSVSYMN WYQQKPDQSPKLLIKAT SNLAS GVPSRFSVSGSGTDFTLTIN SLEAEDAATYYC QQWSSNPLT FGQG TKLEIK |
| 29 | huAb18VL.2 | CDR-L1 | Residuos 24-33 de SEQ ID NO: 123 | RASSSVSYMN |
| 30 | huAb18VL.2 | CDR-L2 | Residuos 49-55 de SEQ ID NO: 123 | ATSNLAS |
| 31 | huAb18VL.2 | CDR-L3 | Residuos 88-96 de SEQ ID NO: 123 | QQWSSNPLT |
| 124 | huAb18VL.2a | VL | | EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRA SSSVSYMN WYQQKPDQSPKRWIYAT SNLAS GVPSRFSVSVSGTDHTLTIN SLEAEDAATYYC QQWSSNPLT FGQG TKLEIK |
| 29 | huAb18VL.2a | CDR-L1 | Residuos 24-33 de SEQ ID NO: 124 | RASSSVSYMN |
| 30 | huAb18VL.2a | CDR-L2 | Residuos 49-55 de SEQ ID NO: 124 | ATSNLAS |
| 31 | huAb18VL.2a | CDR-L3 | Residuos 88-96 de SEQ ID NO: 124 | QQWSSNPLT |

Las regiones variables humanizadas del Ab18 monoclonal murino (descrito anteriormente) se clonaron en vectores de expresión de IgG para la caracterización funcional:

- El Ab18VH.1 humanizado (huAb 18VH.1) es un Ab18 VH humanizado injertado con CDR que contiene secuencias marco de IGHV1-69*06 e IGHJ6*01. También contiene un cambio de Q1E para prevenir la formación de piroglutamato. Las secuencias variables y CDR de huAb18VH.1 se describen en la Tabla 8.
- El Ab18VH1.a humanizado (huAb18VH.1a) es un diseño humanizado con base en huAb 18VH.1 y contiene 4 retromutaciones marco propuestas: M48I, V67T, L69I, K73R. Las secuencias variables y CDR de huAb18VH.1a se describen en la Tabla 8.
- El Ab18VH1.b humanizado (huAb 18VH.1b) es un diseño humanizado con base en huAb 18VH.1 y huAb18VH.1a y contiene 1 retromutación marco propuesta L69I y 3 cambios en la línea germinal HCDR2 N60A, K64Q, D65G. Las secuencias variables y CDR de huAb18VH.1b se describen en la Tabla 8.
- Ab18VL humanizado. 1 (huAb 18VL. 1) es un Ab18 VL humanizado injertado con CDR que contiene las secuencias marco de IGKV1-9*01 e IGKJ2*01. Las secuencias variables y CDR de huAb18VL.1 se describen en la Tabla 8.
- El Ab18VL.1a humanizado (huAb 18VL.1a) es un diseño humanizado con base en huAb 18VL.1 y contiene 6 retromutaciones marco propuestas: A43S, L46P, L47W, G64V, G66V, F71H. Las secuencias variables y CDR de huAb18VL.1a se describen en la Tabla 8.
- El Ab18VL.1b humanizado (huAb 18VL.1b) es un diseño humanizado con base en huAb 18VL.1 y huAb18VL.1a contiene 4 retromutaciones marco propuestas: L46P, L47W, G64V, F71H. Las secuencias variables y CDR de huAb18VL.1b se describen en la Tabla 8.
- El Ab18VL.2 humanizado (huAb18VL.2) es un Ab18 VL humanizado injertado con CDR que contiene las secuencias marco de IGKV6-21*01 e IGKJ2*01. Las secuencias variables y CDR de huAb18VL.2 se describen

en la Tabla 8.

- El Ab18VL.2a humanizado (huAb18VL.2a) es un diseño humanizado con base en huAb18VL.2 y contiene 6 retromutaciones marco propuestas: L46P, L47W, K49Y, G64V, G66V, F71H. Las secuencias variables y CDR de huAb18VL.2a se describen en la Tabla 8.

Por tanto, la humanización de chAb18 dio como resultado 10 anticuerpos humanizados, incluidos huAb18v1, huAb18v2, huAb18v3, huAb18v4, huAb18v5, huAb18v6, huAb18v7, huAb18v8, huAb18v9 y huAb18v10. Las cadenas variables ligera y pesada para cada una de estas versiones humanizadas de Ab18 se proporcionan más abajo:

Tabla 9: Anticuerpos humanizados Ab18 anti-B7-H3

| | |
|-----------|---------------------------|
| huAb18v1 | huAb18 VH1 / huAb18VL1 |
| huAb 18v2 | huAb18 VH1b / huAb18VL1 |
| huAb18v3 | huAb18 VH1a / huAbVL1a |
| huAb 18v4 | huAb18 VH1b / huAb18VL1a |
| huAb 18v5 | huAn18 VH1 / huAb18VL2 |
| huAb 18v6 | huAb18 VH1b / huAb18VL2 |
| huAb 18v7 | huAb18 VH1b / huAb18 VL2a |
| huAb 18v8 | huAb18 VH1a / huAb18 VLIb |
| huAb 18v9 | huAb18 VH1a / huAb18 VL2a |
| huAb18v10 | huAb18 VH1b / huAb18 VLIb |

Ejemplo 10: Caracterización *in vitro* de las Variantes Humanizadas chAb18 Anti-B7-H3

La humanización de chAb18 generó 10 variantes (descritas anteriormente en la Tabla 9) que retuvieron la unión a B7-H3 de humanos y de cyno según lo evaluado por FACS (el método del cual se describe anteriormente en el Ejemplo 6). Estas variantes se caracterizaron adicionalmente para la unión por SPR y se conjugaron con éxito con el sintón CZ inhibidor de Bcl-xL mediante el uso del Método A (descrito anteriormente) y se evaluó la citotoxicidad celular como se describió en el Ejemplo 7. La Tabla 10 resume las características *in vitro* de las diversas variantes de Ab18 humanizado. El chAb18 parental del que se derivaron las variantes también se ensayó como comparador. Todas las variantes humanizadas tenían propiedades de unión similares evaluadas por biacore y retuvieron la actividad de unión a la superficie celular expresada como conjugados con el sintón CZ. La citotoxicidad de todas las variantes como sintones CZ fue similar a la del chAb18 del que se derivaron.

TABLA 10: Caracterización *in vitro* de las variantes humanizadas del Ab18 anti-B7-H3

| Nombre de la variante | Números de la Secuencia | DAR por MS | % agr por SEC | Enlace FACS a hu B7-H3 | Afinidad de mAb desnudos (Biacore, K_D) | Citotoxicidad (línea celular HCC38 IC ₅₀) |
|-----------------------|-------------------------|------------|---------------|------------------------|--|---|
| chAb18-CZ | 24, 28 | 2,3 | | 1,14 | 1,70E-10 | 0,28 |
| huAb18v1-CZ | 116, 120 | 2,6 | 3,3 | 1,27 | 5,20E-10 | 0,39 |
| huAb 18v2-CZ | 118, 120 | 1,8 | 3,3 | 2,25 | 6,90E-10 | 1,19 |
| huAb18v3-CZ | 117, 121 | 2,4 | 3,6 | 1,27 | 2,30E-10 | 0,32 |
| huAb 18v4-CZ | 118, 121 | 2,5 | 5,5 | 0,90 | 5,70E-10 | 0,29 |
| huAb18v5-CZ | 116, 123 | 3,4 | 4,2 | 2,91 | 2,30E-10 | 0,12 |
| huAb 18v6-CZ | 118, 123 | 3,4 | 3,5 | 2,09 | 2,00E-10 | 0,14 |
| huAb 18v7-CZ | 118, 124 | 4,3 | 3,6 | 1,92 | 4,00E-10 | 0,03 |
| huAb 18v8-CZ | 117, 122 | 2,6 | 3,5 | 1,98 | 2,50E-10 | 1,3 |
| huAb 18v9-CZ | 117, 124 | 2,4 | 3,8 | 1,58 | 3,80E-10 | 0,9 |
| huAb18v10-CZ | 118, 122 | 2,7 | 3,2 | 1,19 | 2,50E-10 | 0,57 |

Las variantes de chAb18 humanizadas se conjugaron con el sintón CZ y se ensayaron para determinar la citotoxicidad en la línea celular HCC38. Como se describió en la Tabla 10, la mayoría de los anticuerpos humanizados mostraron una potente citotoxicidad, similar a la observada con el anticuerpo control chAb18.

Ejemplo 11: Eficacia *in vivo* de las variantes del Ab18 humanizado como ADC inhibidores de Bcl-xL

Se seleccionaron seis de las variantes de chAb18 humanizadas en base a los resultados de citotoxicidad *in vitro* descritos en el Ejemplo 10. Específicamente, los anticuerpos huAb18v1, huAb18v3, huAb18v4, huAb18v6, huAb18v7 y huAb18v9 se conjugaron cada uno con el sintón CZ (para formar un ADC anti-B7-H3 CZ) para su evaluación en un modelo de xenoinjerto *in vivo* de cáncer de pulmón de células pequeñas (mediante el uso de las células NCI-H146), como se describió en el Ejemplo 8. El tratamiento de dosis única de los ratones portadores de tumores dio como resultado la inhibición del crecimiento del tumor y el retraso del crecimiento del tumor y los

resultados se resumen en la Tabla 11. Se usó Ab095 como control negativo para el efecto de la administración de IgG, ya que es un anticuerpo no específico para la diana emparejado por isotipo producido contra el toxoide tetánico. Véase Larrick y otros, 1992, Immunological Reviews 69-85. A los ratones se les administraron 6 mg/kg de ADC intraperitonealmente QDx1.

Tabla 11: Eficacia *in vivo* de los ADC anti-B7-H3 (variantes humanizadas de chAb18-CZ)

| ADC | Método de Conjugación | DAR por MS | Dosis ^[a] /vía/régimen | Número de ratones | TGI _{máx} (%) | TGD (%) |
|--------------|-----------------------|------------|-----------------------------------|-------------------|------------------------|---------|
| AB095 | - | n/a | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 0 | 0 |
| huAb18v1-CZ | A | 2,6 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 79 | 45 |
| huAb18v3-CZ | A | 2,4 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 81 | 39 |
| huAB 18v4-CZ | A | 2,5 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 85 | 48 |
| huAB 18v6-CZ | A | 3,4 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 86 | 45 |
| huAb 18v7-CZ | A | 4,3 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 87 | 42 |
| huAb 18v9-CZ | A | 2,4 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 83 | 35 |

^[a] la dosis se administra en mg/kg/día

Como se describió en la Tabla 11, cada uno de los anticuerpos humanizados probados fue capaz de inhibir el crecimiento tumoral en el modelo de xenoinjerto de ratón.

Ejemplo 12: Humanización del anticuerpo chAb3 anti-B7-H3

El anticuerpo quimérico chAb3 anti-B7-H3 se seleccionó para humanización en base a sus propiedades favorables como conjugado inhibidor de Bcl-xL (Bcl-xLi). Los anticuerpos humanizados se generaron en base a las secuencias de CDR variable pesada (VH) y variable ligera (VL) del chAb3. Específicamente, se seleccionaron secuencias de la línea germinal humana para construir anticuerpos chAb3 humanizados injertados con CDR donde los dominios CDR de las cadenas VH y VL del chAb3 se injertaron en diferentes secuencias aceptoras de cadenas pesadas y ligeras humanas. En base a las alineaciones con las secuencias VH y VL del anticuerpo monoclonal chAb3, se seleccionaron las siguientes secuencias humanas como aceptoras:

- IGHV1-69*06 e IGHJ6*01 para construir las secuencias aceptoras de la cadena pesada
- IGKV2-28*01 e IGKJ4*01 para construir las secuencias aceptoras de la cadena ligera

IGHV1-69*06 IGHJ6

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASggtfssyaisWVRQAPGQGLEWMGgiipigtanyaqkfqgRVTI
TADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARxxxxxxxWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 174);

donde xxxxxxxx representa la región CDR-H3.

IGKV2-28*01 IGKJ4

DIVMTQSPLSLPVTGPASISCrssqslhngnyldWYLQKPGQSPQLLIYIgsnrasGVPDRFSGSGS
GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCxxxxxxxxxFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 175);

donde xxxxxxxx representa la región CDR-L3.

Mediante el injerto de las correspondientes CDR VH y VL de chAb3 en dichas secuencias aceptoras, se prepararon secuencias VH y VL injertadas con CDR, humanizadas y modificadas. Para generar anticuerpos humanizados con posibles retromutaciones marco, las mutaciones se identificaron y se introdujeron en las secuencias de anticuerpos injertadas con CDR mediante síntesis *de novo* del dominio variable o cebadores oligonucleotídicos mutagénicos y reacciones en cadena de la polimerasa, o ambos. Se construyen diferentes combinaciones de retromutaciones y otras mutaciones para cada uno de los injertos de CDR como sigue. Los números de residuos de estas mutaciones se basan en el sistema de numeración de Kabat.

Las secuencias de aminoácidos de las diversas regiones variables de las cadenas ligera y pesada humanizadas se describen más abajo en la Tabla 12.

Para las cadenas pesadas huAb3VH.1, uno o más de los siguientes residuos de la interfaz de Vernier y VH/VL se retromutaron como sigue: M48I, V67A, I69L, A71V, K73R, M80V, Y91F, R94G. Para las cadenas ligeras huAb31 VL.1, uno o más de los siguientes residuos de la interfaz de Vernier y VH/VL se retromutaron como sigue: 12V, Y87F.

Las siguientes regiones variables humanizadas del anticuerpo chAb3 monoclonal murino se clonaron en vectores de expresión de IgG para la caracterización funcional:

- El Ab3 VH.1 humanizado (huAb3VH.1) es un Ab3 VH humanizado injertado con CDR que contiene las secuencias marco de IGHV1-69*06 e IGHJ6*01. También contiene un cambio de Q1E para prevenir la formación de piroglutamato.
- 5 • El Ab3 VH.1a humanizado (huAb3VH.1a) es un diseño humanizado con base en huAb3VH.1 y contiene 8 retromutaciones marco propuestas: M48I, V67A, I69L, A71V, K73R, M80V, Y91F, R94G.
- El Ab3 VH.1b humanizado (huAb3VH.1b) es un diseño humanizado entre huAb3VH.1 y huAb3VH.1a y contiene 6 retromutaciones marco propuestas: M48I, V67A, I69L, A71V, K73R, R94G.
- El Ab3 VL.1 humanizado (huAb3VL.1) es un Ab3 VL humanizado injertado con CDR que contiene las secuencias marco de IGKV2-28*01 e IGKJ4*01.
- 10 • El Ab3 VL.1a humanizado (huAb3VL.1a) es un diseño humanizado con base en huAb3VL.1 y contiene 2 retromutaciones marco propuestas: I2V, Y87F.
- El Ab3 VL.1b humanizado (huAb3VL.1b) es un diseño humanizado que contiene solo 1 retromutación marco propuesta: I2V.
- 15 La región variable y las secuencias de aminoácidos de la CDR de los anticuerpos humanizados anteriores se describen en la Tabla 12 más abajo.

TABLA 12: Secuencias VH y VL de las versiones humanizadas del chAb3

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|------------|-----------------------|-----------------------------------|--|
| 125 | huAb3VH.1 | VH | | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKAS GYTFSSYWMH WVRQAPG QGLEWMGL LIHPDSGSTNYNEM FKN RVTITADKSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCARG GGRLYFD YWGQGT TVTVSS |
| 10 | huAb3VH.1 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 125 | GYTFSSYWMH |
| 11 | huAb3VH.1 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 125 | LIHPDSGSTNYNEMFKN |
| 12 | huAb3VH.1 | CDR-H3 | Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 125 | GGRLYFDY |
| 126 | huAb3VH.1a | VH | | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKAS GYTFSSYWMH WVRQAPG QGLEWIG LIHPDSGSTNYNEM FKN RATLTVD RSTSTAYVELS SLRSEDTAVYFCAG GGRLYFD YWGQGT TVTVSS |
| 10 | huAb3VH.1a | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 126 | GYTFSSYWMH |
| 11 | huAb3VH.1a | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 126 | LIHPDSGSTNYNEMFKN |
| 12 | huAb3VH.1a | CDR-H3 | Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 126 | GGRLYFDY |
| 127 | huAb3VH.1b | VH | | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS CKAS GYTFSSYWMH WVRQAPG QGLEWIG LIHPDSGSTNYNEM FKN RATLTVD RSTSTAYMELS SLRSEDTAVYYCAG GGRLYFD YWGQGT TVTVSS |
| 10 | huAb3VH.1b | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 127 | GYTFSSYWMH |
| 11 | huAb3VH.1b | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 127 | LIHPDSGSTNYNEMFKN |
| 12 | huAb3VH.1b | CDR-H3 | Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 127 | GGRLYFDY |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|------------|-----------------------|-----------------------------------|--|
| 128 | huAb3VL.1 | VL | | DIVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSNGDTYLRWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIK |
| 14 | huAb3VL.1 | CDR-L1 | Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 128 | RSSQSLVHSNGDTYLR |
| 7 | huAb3VL.1 | CDR-L2 | Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 128 | KVSNRFS |
| 15 | huAb3VL.1 | CDR-L3 | Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 128 | SQSTHVPYT |
| 129 | huAb3VL.1a | VL | | DVVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSNGDTYLRWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSSQSTHVPYTFGGGTKVEIK |
| 14 | huAb3VL.1a | CDR-L1 | Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 129 | RSSQSLVHSNGDTYLR |
| 7 | huAb3VL.1a | CDR-L2 | Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 129 | KVSNRFS |
| 15 | huAb3VL.1a | CDR-L3 | Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 129 | SQSTHVPYT |
| 130 | huAb3VL.1b | VL | | DVVMTQSPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSNGDTYLRWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPYTFGGGTKVEIK |
| 14 | huAb3VL.1b | CDR-L1 | Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 130 | RSSQSLVHSNGDTYLR |
| 7 | huAb3VL.1b | CDR-L2 | Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 130 | KVSNRFS |
| 15 | huAb3VL.1b | CDR-L3 | Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 130 | SQSTHVPYT |

La humanización del chAb3 dio como resultado 6 anticuerpos humanizados, incluidos huAb3v1, huAb3v2, huAb3v3, huAb3v4, huAb18v5 y huAb3v6. Las cadenas variables ligeras y pesadas para cada una de estas versiones humanizadas de Ab18 se proporcionan más abajo en la Tabla 13.

Tabla 13: Anticuerpos Ab3 humanizados

| | |
|---------|-------------------------|
| huAb3v1 | huAb3 VH1 / huAb3 VL1 |
| huAb3v2 | huAb3 VH1b / huAb3 VL1 |
| huAb3v3 | huAb3 VH1a / huAb3 VL1a |
| huAb3v4 | huAb3 VH1 / huAb3 VL1b |
| huAb3v5 | huAb3 VH1b / huAb3 VL1b |
| huAb3v6 | huAb3 VH1a / huAb3 VL1b |

Ejemplo 13: Caracterización *in vitro* de las variantes humanizadas de chAb3

La humanización de chAb3 generó 6 variantes (descritas en la Tabla 13) que retuvieron la unión a la B7-H3 humana según lo evaluado por FACS (como se describió en el Ejemplo 6). Estas variantes se caracterizaron además por la unión por SPR y como ADC conjugados con el sintón CZ inhibitorio de Bcl-xL (enlazador ojiva). También se evaluó la citotoxicidad celular de los anticuerpos Ab3 humanizados (mediante el uso del ensayo descrito anteriormente en el Ejemplo 7). La Tabla 14 resume las características *in vitro* de las variantes humanizadas del chAb3. Se usó como control un ADC que comprende chAb3 conjugado con el sintón CZ.

TABLA 14: Caracterización *in vitro* de las variantes humanizadas de chAb3

| ADC | Sec. Id. Número | Método de Conjugación | DAR por MS | % agr por SEC | FACS (Unión a hu B7-H3) EC50 (nM) | Afinidad de mA b desnudos (Biacore, K_D) | Citotoxicidad (línea celular HCC38 IC ₅₀) (nM) |
|------------|-----------------|-----------------------|------------|---------------|-----------------------------------|---|--|
| chAb3-CZ | 9, 13 | A | 3,8 | | 0,61 | 1,90E-08 | 0,17 |
| huAb3v1-CZ | 125, 128 | A | 3,6 | 3,3 | 1,45 | 5,20E-10 | 0,53 |
| huAb3v2-CZ | 127, 128 | A | 3,8 | 10,1 | 0,73 | 6,90E-10 | 0,13 |
| huAb3v3-CZ | 126, 129 | A | 3,6 | 2,5 | 1,68 | 2,30E-10 | 9,22 |
| huAb3v4-CZ | 125, 130 | A | 3,1 | 3,1 | n/a | 5,70E-10 | n/a |
| huAb3v5-CZ | 127, 130 | A | 3,1 | 5,9 | 0,85 | 2,30E-10 | 0,17 |
| huAb3v6-CZ | 126, 130 | A | 3,3 | 4,9 | 1,78 | 2,00E-10 | 0,13 |

Ejemplo 14: Eficacia *in vivo* de las Variantes Humanizadas del chAb3 como ADC de Bcl-xL

Se seleccionaron dos de las variantes humanizadas (huAb3v2 y huAb3v6) en base su potente citotoxicidad *in vitro* como conjugados de CZ y propiedades de agregación aceptables para la evaluación en un modelo de xenoinjerto murino *in vivo* de células de cáncer de pulmón de células pequeñas (células NCI-H146) como se describió en los materiales y métodos del ejemplo 8. El tratamiento de dosis única de ratones portadores de tumores dio como resultado la inhibición del crecimiento del tumor y el retraso del crecimiento del tumor para ambos anticuerpos humanizados conjugados con un inhibidor de Bcl-xL ilustrativo, y los resultados se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15: Eficacia *in vivo* de las variantes humanizadas del chAb3-CZ

| ADC | Método de Conjugación | DAR | Dosis ^[a] /vía/régimen | Número de ratones | TGI _{máx} (%) | TGD (%) |
|------------|-----------------------|-----|-----------------------------------|-------------------|------------------------|---------|
| AB095 | - | | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 0 | 0 |
| huAb3v2-CZ | A | 3,8 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 83 | 52 |
| huAb3v6-CZ | A | 3,3 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 91 | 88 |

^[a] la dosis se administra en mg/kg/día

Ejemplo 15: Modificaciones de las CDR de la Variante Humanizada del Anticuerpo huAb3v2

huAb3v2 mostró propiedades favorables de unión y destrucción celular. Sin embargo, un examen de las secuencias de aminoácidos de la región variable de huAb3v2 reveló sitios potenciales de desamidación y/o isomerización.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de huAb3 se describen más abajo, incluyendo la cadena ligera (huAb3VL1) y la cadena pesada (huAb3VH1b). Los sitios potenciales de desamidación y/o isomerización en las CDR de VH (CDR2 en los aminoácidos "ds" y VL (CDR1 en los aminoácidos "ng") están en cursiva y, por lo tanto, se diseñaron para mejorar la fabricación de anticuerpos. Las CDR se describen en letras minúsculas en las secuencias siguientes.

Para hacer variantes de huAb3v2 que carecen de estos sitios potenciales de desamidación y/o isomerización, se mutaron cada uno de los aminoácidos indicados más abajo (x y z; representan los sitios potenciales en la CDR1 de VL y la CDR2 de VH). Las 30 variantes de VL resultantes se emparejaron con la VH original del huAb3v2 y se ensayaron para determinar la unión. Las 29 variantes de VH resultantes se emparejaron con VL original del huAb3v2 y se ensayaron para determinar la unión. Las variantes de VH exitosas se combinaron y probaron con variantes de VL productivas que albergan cambios en LCDR1 para hacer que las variantes humanizadas finales carezcan de los sitios potenciales de desamidación y/o isomerización en las CDR. Las secuencias de aminoácidos de las variantes se proporcionan en la Tabla 16 más abajo. Las secuencias de aminoácidos de la longitud completa de la cadena pesada y la cadena ligera de la variante huAb3v2, huAb3v2.5 se proporcionan en las SEQ ID NO: 170 y 171, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la longitud completa de la cadena pesada y la cadena ligera de la variante huAb3v2, huAb3v2.6 se proporcionan en las SEQ ID NO: 172 y 173, respectivamente.

huAb3 VL1

DIVMTQSP_{LS}LPVTPGEPASISCrssqslvhsngdtylrWYLQKPGQSPQLLIYkvsnrfsGVPDRFSGSGS
 GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCsqsthpvpytFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 128)

xg (15 variantes) (SEQ ID NO: 178)

nz (15 variantes) (SEQ ID NO: 179)

5 huAb3 VH1b

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASgytfssywmhWVRQAPGQGLEWIGLIhpJsgstnynemfknRAT
LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAGggrlyfdyWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 127)

10 (15 variantes) xs (SEQ ID NO: 180)

(14 variantes) dz (SEQ ID NO: 181)

donde (para VL y VH),

15 **x** = Todos los aminoácidos, excepto: M, C, N, D o Q.
z = Todos los aminoácidos, excepto: M, C, G, S, N o P.

Las retromutaciones marco propuestas están subrayadas (véase el Ejemplo 12).

20

Tabla 16: Secuencias de la región variable de las variantes del anticuerpo huAb3v2

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|-----------|-----------------------|-----------------------------------|---|
| 131 | huAb3v2.1 | VH | | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCK AS GYTFSSYWMH WVRQAPGQGLE WIG LIHPWSGSTNYNEMFKN RAT LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDV VYYCAG GGRLYFDY WGQGTTTVTV SS |
| 10 | huAb3v2.1 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 131 | GYTFSSYWMH |
| 132 | huAb3v2.1 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 131 | LIHPWSGSTNYNEMFKN |
| 12 | huAb3v2.1 | CDR-H3 | Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 131 | GGRLYFDY |
| 133 | huAb3v2.1 | VL | | DIVMTQSPPLSLPVTGPGEASIS RSSQSLVHSSGDTYLR WYLQKPG QSPQLLIY KVSNRFS GVDPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CS QSTHVPYT TFGGGTKVEIK |
| 134 | huAb3v2.1 | CDR-L1 | Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 133 | RSSQSLVHSSGDTYLR |
| 7 | huAb3v2.1 | CDR-L2 | Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 133 | KVSNRFS |
| 15 | huAb3v2.1 | CDR-L3 | Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 133 | SQSTHVPYT |
| 131 | huAb3v2.2 | VH | | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCK AS GYTFSSYWMH WVRQAPGQGLE WIG LIHPWSGSTNYNEMFKN RAT LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDV VYYCAG GGRLYFDY WGQGTTTVTV SS |
| 10 | huAb3v2.2 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 131 | GYTFSSYWMH |
| 132 | huAb3v2.2 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 131 | LIHPWSGSTNYNEMFKN |
| 12 | huAb3v2.2 | CDR-H3 | Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 131 | GGRLYFDY |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|-----------|-----------------------|-----------------------------------|--|
| 135 | huAb3v2.2 | VL | | DIVMTQSP LS LPVTPGEPASISC RSSQSLVHSNRDTYLR WYLQKPG QSPQLLIY KVSNRFS GVDPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CSQSTHVPYT FGGGTKVEIK |
| 136 | huAb3v2.2 | CDR-L1 | Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 135 | RSSQSLVHSNRDTYLR |
| 7 | huAb3v2.2 | CDR-L2 | Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 135 | KVSNRFS |
| 15 | huAb3v2.2 | CDR-L3 | Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 135 | SQSTHVPYT |
| 131 | huAb3v2.3 | VH | | EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCK AS GYT FSS YWMH WVRQAPGGGLE WIG LIHPWSGST NYN EMFKN RAT LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAG GGRLY FD Y WGQGT TV TVSS |
| 10 | huAb3v2.3 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 131 | GYTFSSYWMH |
| 132 | huAb3v2.3 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 131 | LIHPWSGST NYN EMFKN |
| 12 | huAb3v2.3 | CDR-H3 | Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 131 | GGRLY FD Y |
| 137 | huAb3v2.3 | VL | | DIVMTQSP LS LPVTPGEPASISC RSSQSLVHSNQD TY LRWYLQKPG QSPQLLIY KVSNRFS GVDPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CSQSTHVPYT FGGGTKVEIK |
| 138 | huAb3v2.3 | CDR-L1 | Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 137 | RSSQSLVHSNQD TY LR |
| 7 | huAb3v2.3 | CDR-L2 | Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 137 | KVSNRFS |
| 15 | huAb3v2.3 | CDR-L3 | Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 137 | SQSTHVPYT |
| 139 | huAb3v2.4 | VH | | EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCK AS GYT FSS YWMH WVRQAPGGGLE WIG LIHPESGST NYN EMFKN RAT LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAG GGRLY FD Y WGQGT TV TVSS |
| 10 | huAb3v2.4 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 139 | GYTFSSYWMH |
| 140 | huAb3v2.4 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 139 | LIHPESGST NYN EMFKN |
| 12 | huAb3v2.4 | CDR-H3 | Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 139 | GGRLY FD Y |
| 133 | huAb3v2.4 | VL | | DIVMTQSP LS LPVTPGEPASISC RSSQSLVHSSGD TY LRWYLQKPG QSPQLLIY KVSNRFS GVDPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CSQSTHVPYT FGGGTKVEIK |
| 134 | huAb3v2.4 | CDR-L1 | Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 133 | RSSQSLVHSSGD TY LR |
| 7 | huAb3v2.4 | CDR-L2 | Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 133 | KVSNRFS |
| 15 | huAb3v2.4 | CDR-L3 | Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 133 | SQSTHVPYT |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|-----------|-----------------------|-----------------------------------|---|
| 139 | huAb3v2.5 | VH | | EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCK ASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLE WIGLIHPESGSTNYNEMFKNRAT LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAGGGRLYFDYWGQGTITVTV SS |
| 10 | huAb3v2.5 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 139 | GYTFSSYWMH |
| 140 | huAb3v2.5 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 139 | LIHPESGSTNYNEMFKN |
| 12 | huAb3v2.5 | CDR-H3 | Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 139 | GGRLYFDY |
| 135 | huAb3v2.5 | VL | | DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLVHSNRDITYLRWYLQKPG QSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIY CSQSTHVPYTFGGGKTKVEIK |
| 136 | huAb3v2.5 | CDR-L1 | Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 135 | RSSQSLVHSNRDITYLR |
| 7 | huAb3v2.5 | CDR-L2 | Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 135 | KVSNRFS |
| 15 | huAb3v2.5 | CDR-L3 | Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 135 | SQSTHVPYT |
| 139 | huAb3v2.6 | VH | | EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCK ASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLE WIGLIHPESGSTNYNEMFKNRAT LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAGGGRLYFDYWGQGTITVTV SS |
| 10 | huAb3v2.6 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 139 | GYTFSSYWMH |
| 140 | huAb3v2.6 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 139 | LIHPESGSTNYNEMFKN |
| 12 | huAb3v2.6 | CDR-H3 | Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 139 | GGRLYFDY |
| 137 | huAb3v2.6 | VL | | DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLVHSNQDITYLRWYLQKPG QSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVIY CSQSTHVPYTFGGGKTKVEIK |
| 138 | huAb3v2.6 | CDR-L1 | Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 137 | RSSQSLVHSNQDITYLR |
| 7 | huAb3v2.6 | CDR-L2 | Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 137 | KVSNRFS |
| 15 | huAb3v2.6 | CDR-L3 | Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 137 | SQSTHVPYT |
| 141 | huAb3v2.7 | | | EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCK ASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLE WIGLIHPISGSTNYNEMFKNRAT LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAGGGRLYFDYWGQGTITVTV SS |
| 10 | huAb3v2.7 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 141 | GYTFSSYWMH |
| 142 | huAb3v2.7 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 141 | LIHPISGSTNYNEMFKN |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|-----------|-----------------------|-----------------------------------|--|
| 12 | huAb3v2.7 | CDR-H3 | Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 141 | GGRLYFDY |
| 133 | huAb3v2.7 | | | DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCS RSSQSLVHSSGDTYLR WYLQKPG QSPQLLIY KVSNRFS GVDPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CSQSTHVPYTF GGGKVEIK |
| 134 | huAb3v2.7 | CDR-L1 | Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 133 | RSSQSLVHSSGDTYLR |
| 7 | huAb3v2.7 | CDR-L2 | Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 133 | KVSNRFS |
| 15 | huAb3v2.7 | CDR-L3 | Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 133 | SQSTHVPYT |
| 141 | huAb3v2.8 | VH | | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK AS GYTFSSYWMH WVRQAPGQGLE WIGLI HPISGSTNYNEMFKN RAT LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAG GGRLYFDY WGQGT |
| 10 | huAb3v2.8 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 141 | GYTFSSYWMH |
| 142 | huAb3v2.8 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 141 | LIHPISGSTNYNEMFKN |
| 12 | huAb3v2.8 | CDR-H3 | Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 141 | GGRLYFDY |
| 135 | huAb3v2.8 | VL | | DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCS RSSQSLVHSNRD TYLRWYLQKPG QSPQLLIY KVSNRFS GVDPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CSQSTHVPYTF GGGKVEIK |
| 136 | huAb3v2.8 | CDR-L1 | Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 135 | RSSQSLVHSNRD TYLR |
| 7 | huAb3v2.8 | CDR-L2 | Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 135 | KVSNRFS |
| 15 | huAb3v2.8 | CDR-L3 | Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 135 | SQSTHVPYT |
| 141 | huAb3v2.9 | VH | | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK AS GYTFSSYWMH WVRQAPGQGLE WIGLI HPISGSTNYNEMFKN RAT LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAG GGRLYFDY WGQGT |
| 10 | huAb3v2.9 | CDR-H1 | Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 141 | GYTFSSYWMH |
| 142 | huAb3v2.9 | CDR-H2 | Residuos 50-66 de SEQ ID NO: 141 | LIHPISGSTNYNEMFKN |
| 12 | huAb3v2.9 | CDR-H3 | Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 141 | GGRLYFDY |
| 137 | huAb3v2.9 | VL | | DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCS RSSQSLVHSNQD TYLRWYLQKPG QSPQLLIY KVSNRFS GVDPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CSQSTHVPYTF GGGKVEIK |
| 138 | huAb3v2.9 | CDR-L1 | Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 137 | RSSQSLVHSNQD TYLR |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|-----------|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| 7 | huAb3v2.9 | CDR-L2 | Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 137 | KVSNRFS |
| 15 | huAb3v2.9 | CDR-L3 | Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 137 | SQSTHVPYT |

10 Ejemplo 16: Caracterización *in vitro* de las Variantes de huAb3v2

La eliminación de los sitios potenciales de desamidación y/o isomerización (descritos en el Ejemplo 15) generó solo 6 variantes que retuvieron la unión a ambos B7-H3 de humanos y de cyno expresados exógenamente en fibroblastos 3T12 de ratón según lo evaluado por FACS (como se describió en los métodos del Ejemplo 6).

Estos nuevos anticuerpos anti-B7-H3 se caracterizaron adicionalmente para la unión por SPR y se conjugaron con el sintón CZ Bcl-xLi y se evaluó la citotoxicidad celular (mediante el uso de los métodos descritos en el Ejemplo 7). La Tabla 17 proporciona características *in vitro* de seis variantes humanizadas de huAb3v2.

Tabla 17: Caracterización *in vitro* de las variantes humanizadas de huAb3v2, incluidos los anticuerpos desnudos y los ADC

| ADC | Número de la Secuencia | Método de Conjugación | DAR por MS | % agr por SEC | ELISA hB7-H3 EC ₅₀ nM | FACS (EC ₅₀ nM) hB7-H3 cyB7-H3 | Afinidad de mAb desnudos (Biacore, K _D) | Citotoxicidad (línea celular H847 IC ₅₀) (nM) |
|--------------|------------------------|-----------------------|------------|---------------|----------------------------------|---|---|---|
| huAb3v2-CZ | 127, 128 | A | 3,5 | | 0,44 | 5,11 | 2,30E-09 | 1,49 |
| huAb3v2.2-CZ | 131, 135 | A | 0,7 | 1,8 | 0,10 | 5,29 | Ajuste pobre | 26,7 |
| huAb3v2.3-CZ | 131, 137 | A | 1,1 | 1,5 | 0,11 | 6,50 | Ajuste pobre | - |
| huAb3v2.5-CZ | 139, 135 | A | 3,4 | 15,6 | 0,13 | 5,14 | 5,30E-09 | 1,57 |
| huAb3v2.6-CZ | 139, 137 | A | 3,3 | 15 | 0,09 | 5,64 | 5,80E-08 | 1,70 |
| huAb3v2.8-CZ | 141, 135 | A | 2,0 | 5,7 | 0,14 | 3,94 | Ajuste pobre | 2,36 |
| huAb3v2.9-CZ | 141, 137 | A | 2,7 | 4,3 | 0,16 | 6,16 | Ajuste pobre | 2,30 |

Como se describió en la Tabla 17, los resultados mostraron que las seis variantes de huAb3v2 tenían propiedades de unión similares a las células que expresan B7-H3 de humanos o de cyno en comparación con el huAb3v2 parental. De las seis variantes de huAb3v2, cuatro anticuerpos (huAb3v2.5, huAb3v2.6, huAb3v2.8, huAb3v2.9) mostraron una potente citotoxicidad en células H847 cuando se conjugaron con sintón CZ Bcl-xLi ilustrativo.

Ejemplo 17: Humanización del Anticuerpo chAb13 Anti-B7-H3

El anticuerpo quimérico anti-B7-H3 chAb13 se seleccionó para humanización en base a sus características de unión y propiedades favorables como un ADC (conjugado con un inhibidor de Bcl-xL).

Antes de la humanización, se modificó el chAb13 para minimizar la desamidación potencial en la cadena ligera CDR3 (QQYNSYPFT (SEQ ID NO: 182); el sitio de desamidación potencial se indica como residuos "NS" (en cursiva)). Se introdujeron mutaciones puntuales en la posición del aminoácido correspondiente a "N" y/o "S" dentro de la CDR3 de cadena ligera del chAb13, dando como resultado 30 variantes. Los anticuerpos que contienen estas variantes de la cadena ligera de CDR3 se seleccionaron luego para determinar su capacidad para retener las características de unión del chAb13. Las variantes que comprenden una CDR3 que tiene una mutación puntual de triptófano (W) en lugar de la serina "S" en el motivo "NS" (es decir, QQYNWYPFT (SEQ ID NO: 39)) retuvieron las características de unión del anticuerpo chAb13 original. La sustitución del residuo S por un residuo W dentro de la CDR3 fue sorprendente dadas las diferencias estructurales entre la serina y el triptófano, así como también el papel significativo que desempeña la CDR3 en la unión al antígeno.

Se generaron anticuerpos humanizados en base a las secuencias de la CDR variable pesada (VH) y variable ligera (VL) del chAb13, que incluye la CDR3 de la cadena ligera "NW". Específicamente, se seleccionaron secuencias de la línea germinal humana para construir anticuerpos chAb13 humanizados injertados con CDR, donde los dominios CDR de las cadenas VH y VL se injertaron en diferentes secuencias aceptoras de cadenas pesadas y ligeras humanas. En base a las alineaciones con las secuencias VH y VL del anticuerpo monoclonal chAb13, se seleccionaron las siguientes secuencias humanas como aceptoras:

- IGHV4-b*01(0-1) e IGHJ6*01 para construir las secuencias aceptoras de la cadena pesada
- IGKV1-39*01 e IGKJ2*01 para construir las secuencias aceptoras de la cadena ligera
- IGHV4-b_IGHJ6

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAVSgysissgyywgWIRQPPGKGLEWIGsiyhsgstyynpslksRVTISV
DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARxxxxxxxWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 176);

donde xxxxxx representa la región CDR-H3.

IGKV1-39_IGKJ2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCrasqsissylnWYQQKPGKAPKLLIYaasslqsgVPSRFSGSGSGTD
FTLTISLQPEDFATYYCxxxxxxxxxFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 177);

donde xxxxxxxx representa la región CDR-L3.

Al injertar la CDR3 de la cadena ligera "NW" y las cinco CDR VH y VL correspondientes restantes de chAb13 en dichas secuencias aceptoras, se prepararon secuencias VH y VL modificadas, humanizadas e injertadas con CDR. Para generar anticuerpos humanizados con posibles retromutaciones marco, las mutaciones se identificaron e introdujeron en las secuencias de anticuerpos injertadas con CDR mediante síntesis *de novo* del dominio variable, o cebadores oligonucleotídicos mutagénicos y reacciones en cadena de la polimerasa, o ambos mediante métodos bien conocidos en la técnica. Se construyeron diferentes combinaciones de retromutaciones y otras mutaciones para cada uno de los injertos de CDR como sigue. Los números de residuos de estas mutaciones se basan en el sistema de numeración de Kabat.

Las siguientes regiones variables humanizadas de los anticuerpos chAb13 monoclonales murinos se clonaron en vectores de expresión de IgG para la caracterización funcional:

- El Ab13 VH.1 humanizado (huAb13VH.1) es un Ab13 VH humanizado injertado con CDR que contiene las secuencias marco de IGHV4-b*01(0-1) e IGHJ6*01. También contiene un cambio de Q1E para prevenir la formación de piroglutamato.
- El Ab13 VH.1 humanizado (huAb13 VH.1a) es un diseño humanizado en base a huAb13VH.1 y contiene 9 retromutaciones marco propuestas: S25T, P40F, K43N, I48M, V67I, T68S, V71R, S79F, R94G.
- El Ab13 VH.1b humanizado (huAb13VH.1b) es un diseño intermedio entre huAb13VH.1 y huAb13VH.1a y contiene 4 retromutaciones marco propuestas: K43N, I48M, V67I, V71R.
- El Ab13 VL.1 humanizado (huAb13VL.1) es un Ab13 VL humanizado injertado con CDR que contiene las secuencias marco de IGKV1-39*01 e IGHJ6*01.

- El Ab13 VL.1a humanizado (huAb13VL.1a) es un diseño humanizado con base en huAb13VL.1 y contiene 4 retromutaciones marco propuestas: A43S, L46A, T85E, Y87F.
- El Ab13 VL.1b humanizado (huAb13VL.1b) es un diseño intermedio entre huAb13VL.1 y huAb13VL.1a y contiene 1 retromutación marco propuesta: Y87F.

5

La región variable y las secuencias de aminoácidos de la CDR de lo anterior se describen en la Tabla 18 más abajo.

Tabla 18: Secuencias de aminoácidos de la región variable del Ab13 humanizado

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|-------------|-----------------------|-----------------------------------|--|
| 143 | huAb13VL.1 | VL | | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CKASQNVGFNVAWYQQKPGKAP KLLIY SASYRYS GVPSRFRSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYNWYPFTFGQGTKLEIK |
| 37 | huAb13VL.1 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 143 | KASQNVGFNVA |
| 38 | huAb13VL.1 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 143 | SASYRYS |
| 39 | huAb13VL.1 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 143 | QQYNWYPFT |
| 144 | huAb13VL.1a | VL | | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CKASQNVGFNVAWYQQKPGKSP KALIIY SASYRYS GVPSRFRSGSG SGTDFTLTISLQPEDFAEYFC QQYNWYPFTFGQGTKLEIK |
| 37 | huAb13VL.1a | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 144 | KASQNVGFNVA |
| 38 | huAb13VL.1a | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 144 | SASYRYS |
| 39 | huAb13VL.1a | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 144 | QQYNWYPFT |
| 146 | huAb13VH.1 | VH | | EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTC AVSGYSITSGYSWHWIRQPPGK GLEWIGY YIHSSGSTNYPNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAR YDDYFEY WGQGT TVTVSS |
| 33 | huAb13VH.1 | CDR-H1 | Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 146 | GYSITSGYSWH |
| 34 | huAb13VH.1 | CDR-H2 | Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 146 | YIHSSGSTNYPNPSLKS |
| 35 | huAb13VH.1 | CDR-H3 | Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 146 | YDDYFEY |
| 145 | huAb13VL.1b | VL | | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITIT CKASQNVGFNVAWYQQKPGKAP KLLIY SASYRYS GVPSRFRSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYFC QQYNWYPFTFGQGTKLEIK |
| 37 | huAb13VL.1b | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 145 | KASQNVGFNVA |
| 38 | huAb13VL.1b | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 145 | SASYRYS |
| 39 | huAb13VL.1b | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 145 | QQYNWYPFT |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|-------------|-----------------------|-----------------------------------|---|
| 147 | huAb13VH.1a | VH | | EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTC AVT GYSITSGYSWH WIRQFPGN GLEWMGY YHSSGSTNYPNPSLKS RISISRDTSKNQFFLKLSSVTA ADTAVYYCAG YDDYFEY WGQGT TVTVSS |
| 33 | huAb13VH.1a | CDR-H1 | Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 147 | GYSITSGYSWH |
| 34 | huAb13VH.1a | CDR-H2 | Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 147 | YHSSGSTNYPNPSLKS |
| 35 | huAb13VH.1a | CDR-H3 | Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 147 | YDDYFEY |
| 148 | huAb13VH.1b | VH | | EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTC AVS GYSITSGYSWH WIRQPPGN GLEWMGY YHSSGSTNYPNPSLKS RITISRDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARY YDDYFEY WGQGT TVTVSS |
| 33 | huAb13VH.1b | CDR-H1 | Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 148 | GYSITSGYSWH |
| 34 | huAb13VH.1b | CDR-H2 | Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 148 | YHSSGSTNYPNPSLKS |
| 35 | huAb13VH.1b | CDR-H3 | Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 148 | YDDYFEY |

Ejemplo 18: Generación de las variantes del huAb13

Las secuencias de aminoácidos de la región 3 VH y 3 VL de las variantes de Ab13 humanizadas descritas en la Tabla 18 se emparejaron para generar 9 variantes de huAb13 descritas en la Tabla 19. Las secuencias de aminoácidos de la longitud completa de la cadena pesada y la cadena ligera de la variante huAb13v1, huAb13v1 se proporcionan en las SEQ ID NO: 168 y 169, respectivamente.

Tabla 19: Secuencias de las regiones variables de las variantes de huAb13 diseñadas

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de aminoácidos |
|------------|----------|-----------------------|-----------------------------------|---|
| 147 | huAb13v1 | VH | | EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTC AVT GYSITSGYSWH WIRQFPGNGLEW MGY YHSSGSTNYPNPSLKS RISISR DTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYC AG YDDYFEY WGQGTTVTVSS |
| 33 | huAb13v1 | CDR-H1 | Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 147 | GYSITSGYSWH |
| 34 | huAb13v1 | CDR-H2 | Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 147 | YHSSGSTNYPNPSLKS |
| 35 | huAb13v1 | CDR-H3 | Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 147 | YDDYFEY |
| 144 | huAb13v1 | VL | | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKSPKALI YSASRYRSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFAEYFCQ QYNWYPF TFGQGTKLEIK |
| 37 | huAb13v1 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 144 | KASQNVGFNVA |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de aminoácidos |
|------------|----------|-----------------------|-----------------------------------|--|
| 38 | huAb13v1 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 144 | SASYRYS |
| 39 | huAb13v1 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 144 | QQYNWYPFT |
| 146 | huAb13v2 | VH | | EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAV SGYSITSGYSWHWIRQPPGKGLEW IGYIHSSGSTNYPNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYFEYWGQGTITVTVSS |
| 33 | huAb13v2 | CDR-H1 | Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 146 | GYSITSGYSWH |
| 34 | huAb13v2 | CDR-H2 | Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 146 | YIHSSGSTNYPNPSLK |
| 35 | huAb13v2 | CDR-H3 | Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 146 | YDDYFEY |
| 143 | huAb13v2 | VL | | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKAPKLLI Y SASYRYS GVPSRFRSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYC QQYNWYPF TFGQGTKLEIK |
| 37 | huAb13v2 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 143 | KASQNVGFNVA |
| 38 | huAb13v2 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 143 | SASYRYS |
| 39 | huAb13v2 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 143 | QQYNWYPFT |
| 146 | huAb13v3 | VH | | EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAV SGYSITSGYSWHWIRQPPGKGLEW IGYIHSSGSTNYPNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYFEYWGQGTITVTVSS |
| 33 | huAb13v3 | CDR-H1 | Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 146 | GYSITSGYSWH |
| 34 | huAb13v3 | CDR-H2 | Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 146 | YIHSSGSTNYPNPSLK |
| 35 | huAb13v3 | CDR-H3 | Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 146 | YDDYFEY |
| 144 | huAb13v3 | VL | | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKSPKALI Y SASYRYS GVPSRFRSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFAEYFC QQYNWYPF TFGQGTKLEIK |
| 37 | huAb13v3 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 144 | KASQNVGFNVA |
| 38 | huAb13v3 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 144 | SASYRYS |
| 39 | huAb13v3 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 144 | QQYNWYPFT |
| 146 | huAb13v4 | VH | | EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAV SGYSITSGYSWHWIRQPPGKGLEW IGYIHSSGSTNYPNPSLKSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYFEYWGQGTITVTVSS |
| 33 | huAb13v4 | CDR-H1 | Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 146 | GYSITSGYSWH |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de aminoácidos |
|------------|----------|-----------------------|-----------------------------------|---|
| 34 | huAb13v4 | CDR-H2 | Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 146 | YIHSSGSTNYNPSLKS |
| 35 | huAb13v4 | CDR-H3 | Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 146 | YDDYFEY |
| 145 | huAb13v4 | VL | | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCK ASQNVGFNVA WYQQKPGKAPKLLI Y SASYRYS GVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYFC QQYNWYPF TFGQGTKLEIK |
| 37 | huAb13v4 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 145 | KASQNVGFNVA |
| 38 | huAb13v4 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 145 | SASYRYS |
| 39 | huAb13v4 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 145 | QQYNWYPFT |
| 147 | huAb13v5 | VH | | EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAV T GYSITSGYSWH WIRQFPGNGLEW MGY IHSSGSTNYNPSLKS RISISR DTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYC AGY DDYFEY WGQGTITVTVSS |
| 33 | huAb13v5 | CDR-H1 | Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 147 | GYSITSGYSWH |
| 34 | huAb13v5 | CDR-H2 | Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 147 | YIHSSGSTNYNPSLKS |
| 35 | huAb13v5 | CDR-H3 | Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 147 | YDDYFEY |
| 143 | huAb13v5 | VL | | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCK ASQNVGFNVA WYQQKPGKAPKLLI Y SASYRYS GVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYC QQYNWYPF TFGQGTKLEIK |
| 37 | huAb13v5 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 143 | KASQNVGFNVA |
| 38 | huAb13v5 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 143 | SASYRYS |
| 39 | huAb13v5 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 143 | QQYNWYPFT |
| 147 | huAb13v6 | VH | | EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAV T GYSITSGYSWH WIRQFPGNGLEW MGY IHSSGSTNYNPSLKS RISISR DTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYC AGY DDYFEY WGQGTITVTVSS |
| 33 | huAb13v6 | CDR-H1 | Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 147 | GYSITSGYSWH |
| 34 | huAb13v6 | CDR-H2 | Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 147 | YIHSSGSTNYNPSLKS |
| 35 | huAb13v6 | CDR-H3 | Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 147 | YDDYFEY |
| 145 | huAb13v6 | VL | | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCK ASQNVGFNVA WYQQKPGKAPKLLI Y SASYRYS GVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYFC QQYNWYPF TFGQGTKLEIK |
| 37 | huAb13v6 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 145 | KASQNVGFNVA |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de aminoácidos |
|------------|----------|-----------------------|-----------------------------------|--|
| 37 | huAb13v6 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 145 | KASQNVGFNVA |
| 38 | huAb13v6 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 145 | SASYRYS |
| 39 | huAb13v6 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 145 | QQYNWYPFT |
| 148 | huAb13v7 | VH | | EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAV SGYSITSGYSWHWIRQPPNGLEW MGYIHSSGSTNYPNPSLKSRITISR DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYFEYWGQGTITVTVSS |
| 33 | huAb13v7 | CDR-H1 | Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 148 | GYSITSGYSWH |
| 34 | huAb13v7 | CDR-H2 | Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 148 | YIHSSGSTNYPNPSLK |
| 35 | huAb13v7 | CDR-H3 | Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 148 | YDDYFEY |
| 143 | huAb13v7 | VL | | DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNWYPF TFGQGTKLEIK |
| 37 | huAb13v7 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 143 | KASQNVGFNVA |
| 38 | huAb13v7 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 143 | SASYRYS |
| 39 | huAb13v7 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 143 | QQYNWYPFT |
| 148 | huAb13v8 | VH | | EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAV SGYSITSGYSWHWIRQPPNGLEW MGYIHSSGSTNYPNPSLKSRITISR DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYFEYWGQGTITVTVSS |
| 33 | huAb13v8 | CDR-H1 | Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 148 | GYSITSGYSWH |
| 34 | huAb13v8 | CDR-H2 | Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 148 | YIHSSGSTNYPNPSLK |
| 35 | huAb13v8 | CDR-H3 | Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 148 | YDDYFEY |
| 144 | huAb13v8 | VL | | DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKSPKALI YSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFAEYFCQQYNWYPF TFGQGTKLEIK |
| 37 | huAb13v8 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 144 | KASQNVGFNVA |
| 38 | huAb13v8 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 144 | SASYRYS |
| 39 | huAb13v8 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 144 | QQYNWYPFT |
| 148 | huAb13v9 | VH | | EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAV SGYSITSGYSWHWIRQPPNGLEW MGYIHSSGSTNYPNPSLKSRITISR DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYFEYWGQGTITVTVSS |

(continuación)

| SEQ ID NO: | Clon | Región de la Proteína | Residuos | Secuencia de aminoácidos |
|------------|----------|-----------------------|-----------------------------------|--|
| 33 | huAb13v9 | CDR-H1 | Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 148 | GYSITSGYSWH |
| 34 | huAb13v9 | CDR-H2 | Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 148 | YIHSSGSTNYPNLSKS |
| 35 | huAb13v9 | CDR-H3 | Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 148 | YDDYFEY |
| 145 | huAb13v9 | VL | | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCK ASQNVGFNVA WYQQKPGKAPKLLI Y SASYRYS GVPSRFSGSGSGTDF LTISSLQPEDFATYFC QQYNWYPF TFGQGTKLEIK |
| 37 | huAb13v9 | CDR-L1 | Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 145 | KASQNVGFNVA |
| 38 | huAb13v9 | CDR-L2 | Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 145 | SASYRYS |
| 39 | huAb13v9 | CDR-L3 | Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 145 | QQYNWYPFT |

Ejemplo 19: Caracterización de las Variantes Humanizadas del huAb13 VL.1a

Se generaron nueve variantes del huAb13 descritas en los Ejemplos 17 y 18 y se ensayaron para determinar la unión a B7-H3 mediante FACS (de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 6). Seis variantes no se unieron a la B7-H3 humana. Las tres variantes restantes se caracterizaron adicionalmente para la unión por SPR y se conjugaron (mediante el Método A) con el inhibidor de Bcl-xL (específicamente la ojiva enlazadora (o sintón) CZ) y se evaluó la citotoxicidad celular (de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 7). La Tabla 20 proporciona las características *in vitro* de estas variantes.

Tabla 20: Caracterización *in vitro* de las variantes de huAb13 VL.1a conjugadas con el sintón (o carga útil del enlazador) CZ

| Nombre de la variante | Número de la Secuencia | DAR por MS | % agr por SEC | ELISA hB7-H3 EC ₅₀ nM | FACS (EC ₅₀ nM) | | Afinidad de los mAb desnudos (Biacore, K _D) | Citotoxicidad de la línea celular H847 (IC ₅₀ nM) |
|-----------------------|------------------------|------------|---------------|----------------------------------|----------------------------|---------|---|--|
| | | | | | hB7-H3 | cyB7-H3 | | |
| chAb13-CZ | 32, 36 | - | - | 0,26 | 6,27 | 18,35 | 5,7E-09 | - |
| huAb13v1-CZ | 147, 144 | 4,0 | 5,1 | 0,12 | 6,01 | 10,0 | 6,2E-09 | 0,09 |
| huAb13v5-CZ | 147, 143 | 3,4 | 2,4 | 0,19 | 5,21 | 10,59 | Ajuste pobre | 1,60 |
| huAb 13v6-CZ | 147, 145 | 3,6 | 7,3 | 0,14 | 5,83 | 12,95 | Ajuste pobre | 0,84 |

HuAb13v1 se seleccionó para estudios adicionales debido en parte a su potente y superior citotoxicidad contra las células H847 y características de unión similares a las de chAb13 de las que se deriva. Por el contrario, huAb13v5 y huAb13v6 mostraron una cinética de ajuste pobre en los experimentos de Biacore, lo que sugiere que sus propiedades de unión son más divergentes de la chAb13 parental que de huAb13v1 y tienen una actividad reducida en el ensayo de destrucción celular.

Ejemplo 20: Potencia *in vitro* de los Anticuerpos B7-H3 Humanizados Seleccionados con Ojivas Enlazadoras (Sintón) del Inhibidor de Bcl-xL Ilustrativo

Se seleccionaron los anticuerpos humanizados huAb13v1, huAb3v2.5 y huAb3v2.6 para conjugarlos con varias cargas útiles del inhibidor de Bcl-xL (o sintones) a una escala de 3 mg mediante el uso de los métodos A, E o G, como se describió en el ejemplo 7. La actividad antitumoral de estos ADC se ensayó en ensayos de citotoxicidad mediante el uso de la línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas NCI-H1650 como se describió en el Ejemplo 7. Como control, también se evaluó la actividad antitumoral *in vitro* de los ADC que comprenden el anticuerpo no específico para MSL109 (un anticuerpo monoclonal que se une a la glicoproteína H de CMV conjugada con cargas útiles (o sintones) del inhibidor de Bcl-xL. Los resultados se describen en la Tabla 21.

Tabla 21: Citotoxicidad *in vitro* de las células tumorales de ADC B7-H3 humanizados seleccionados con ojivas enlazadoras (sintones) del inhibidor de Bcl-xL ilustrativo

| ADC | Método de Conjugación | DAR por MS | % agr por SEC | Concentración de ADC (mg/ml) | EC ₅₀ nM H1650 |
|---------------|-----------------------|------------|---------------|------------------------------|---------------------------|
| huAb13v1-CZ | G | 4 | 3,9 | 3 | 0,18 |
| huAb13v1-TX | G | 3,6 | 2,8 | 2,6 | 0,22 |
| huAb13v1-TV | G | 2,4 | 3 | 3,9 | 0,43 |
| huAb13v1-AAA | G | 2 | 20,2 | 2,7 | 0,37 |
| huAb13v1-AAD | G | 3,7 | 3,3 | 2,7 | 0,21 |
| huAb13v1-WD | E | 3 | 5,4 | 5,8 | 0,45 |
| huAb13v1-LB | A | 2,2 | 21,9 | 3,7 | > 133 |
| huAb13v1-ZT | G | 2,4 | 10,6 | 1,7 | 0,3 |
| huAb13v1-ZZ | G | 1,4 | 20,3 | 2,5 | 0,42 |
| huAb13v1-XW | G | 4,3 | 6,3 | 2,6 | 0,86 |
| huAb13v1-SE | A | 3,7 | 4 | 5,4 | 0,63 |
| huAb13v1-SR | A | 2,6 | 49,5 | 4,5 | 0,59 |
| huAb13v1-YG | E | 3,3 | 2,1 | 3,8 | 0,33 |
| huAb13v1-KZ | A | 2,8 | 16,8 | 3,5 | 178,8 |
| huAb3v2.5-CZ | G | 3,3 | 15,6 | 3,6 | 0,40 |
| huAb3v2.5-TX | G | 3,3 | 8,9 | 2,9 | 0,62 |
| huAb3v2.5-TV | G | 3,7 | 10,4 | 3,5 | 0,53 |
| huAb3v2.5-YY | G | 2,3 | 16,2 | 3,2 | 0,71 |
| huAb3v2.5-AAA | G | 2 | 14,8 | 3,3 | 0,85 |
| huAb3v2.5-AAD | G | 3,4 | 11,3 | 3,7 | 0,49 |
| huAb3v2.5-WD | E | 2,8 | 11,5 | 5,4 | 0,83 |
| huAb3v2.5-LB | A | 2,2 | 24,4 | 3,9 | 2,59 |
| huAb3v2.5-ZT | G | 1,6 | 20,1 | 3,3 | 0,95 |
| huAb3v2.5-ZZ | G | 1,2 | 19,4 | 3,7 | 1,1 |
| huAb3v2.5-XW | G | 3,9 | 16,4 | 3,4 | 2,18 |
| huAb3v2.5-SE | A | 3,7 | 10,6 | 5,4 | 0,85 |
| huAb3v2.5-SR | A | 1,8 | 48,5 | 5,1 | 0,59 |
| huAb3v2.5-YG | E | 4 | 8,6 | 3,3 | 0,71 |
| huAb3v2.5-KZ | A | 2,6 | 24,5 | 3,4 | 0,87 |
| huAb3v2.6-CZ | G | 3,4 | 15 | 3,6 | 0,40 |
| huAb3v2.6-TX | G | 3,2 | 10,4 | 3,4 | 0,47 |
| huAb3v2.6-TV | G | 3,3 | 10,7 | 3,8 | 0,52 |
| huAb3v2.6-YY | G | 2,2 | 19,9 | 3,4 | 0,72 |
| huAb3v2.6-AAA | G | 1,9 | 20,2 | 3,6 | 1,24 |
| huAb3v2.6-AAD | G | 3,4 | 11,9 | 3,7 | 0,85 |
| huAb3v2.6-WD | E | 3,1 | 12,4 | 5,3 | 0,79 |
| huAb3v2.6-LB | A | 2,4 | 27,2 | 3,9 | 2,07 |
| huAb3v2.6-ZT | G | 1,7 | 21,6 | 3,7 | 1,11 |
| huAb3v2.6-ZZ | G | 1,2 | 20,7 | 3,5 | 1,35 |
| huAb3v2.6-XW | G | 4 | 16,8 | 3,2 | 2,4 |
| huAb3v2.6-SE | A | 3,6 | 11,8 | 5,7 | 1,01 |
| huAb3v2.6-SR | A | 2,5 | 48,2 | 5,2 | 0,71 |
| huAb3v2.6-YG | E | 3,7 | 9,9 | 4,8 | 0,68 |
| huAb3v2.6-KZ | A | 3,5 | 26,1 | 3,6 | 5,52 |
| MSL109-CZ | G | 3,2 | 0,5 | 3,7 | 19,50 |
| MSL109-TX | G | 3,5 | 0,7 | 3 | 20,00 |
| MSL109-TV | G | 3,6 | 0 | 2,6 | 31,13 |
| MSL109-YY | G | 2,9 | 0 | 1,8 | 26,53 |
| MSL109-AAA | G | 1,9 | 13,7 | 3,2 | 23,52 |
| MSL109-AAD | G | 3 | 0,4 | 3,8 | > 67 |
| MSL109-WD | E | 2,9 | 0 | 7,06 | 18,22 |
| MSL109-LB | A | 1,8 | 0 | 4,2 | 9,88 |
| MSL109-ZT | G | 2,3 | 7,5 | 2,2 | > 67 |
| MSL109-ZZ | G | 1,4 | 15 | 3,5 | > 67 |
| MSL109-XW | G | 3,3 | 3,7 | 3,2 | > 67 |
| MSL109-SE | A | 3,6 | 33,4 | 6,0 | 29,56 |
| MSL109-SR | A | 1,8 | 2,3 | 3,8 | 53,29 |
| MSL109-YG | E | 3,1 | 13,2 | 4,0 | 19,93 |
| MSL109-KZ | A | 2,5 | 18 | 4,3 | 50,16 |

En contraste con la baja actividad antitumoral exhibida por los ADC que comprenden el anticuerpo no específico para MSL109 conjugado con una carga útil del inhibidor de Bcl-xL, los ADC dirigidos a B7-H3 exhibieron una mayor destrucción de células tumorales, lo que refleja la entrega de antígeno dependiente de los ADC dirigidos a B7-H3 a las células tumorales que expresan B7-H3.

La actividad antitumoral de dos de estos ADC se ensayó en ensayos de citotoxicidad mediante el uso de la línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas NCI-H146 como se describió en el Ejemplo 7. Los resultados se describen en la Tabla 22.

Tabla 22: Citotoxicidad *in vitro* de las células tumorales de ADC B7-H3 humanizado seleccionado con sintones inhibidores de Bcl-xL ilustrativos.

| ADC | Método de Conjugación | DAR | % agr por SEC | Concentración de ADC (mg/ml) | EC ₅₀ nM H146 |
|-----------------|-----------------------|-----|---------------|------------------------------|--------------------------|
| huAb13v1-AAA E2 | I | 2 | 3,3 | 11,6 | 2 |
| huAb13v1-WD E2 | I | 2 | 4,5 | 14,5 | 2 |

Se ensayó la citotoxicidad de huAb13v1-AAA E2 y huAb13v1-WD E2 mediante el uso de células H146. Ambos conjugados muestran una citotoxicidad potente y comparable.

Ejemplo 21: Análisis *in vivo* de los ADC anti-B7-H3

Se seleccionaron los anticuerpos humanizados anti-B7-H3 huAb13v1, huAb3v2.5 y huAb3v2.6 para conjugarlos con varias cargas útiles del inhibidor de Bcl-xL y se evaluaron en modelos de xenoinjerto de cáncer de pulmón de células pequeñas (H146) como conjugados mediante el uso de una serie de ojivas inhibidoras (sintones) de Bcl-xL mediante el uso de los métodos descritos en el Ejemplo 7 y el Ejemplo 8. Los resultados se resumen en la Tabla 23 y la Tabla 24.

Tabla 23: Eficacia *in vivo* de los ADC anti-B7-H3 humanizados

| ADC | Método de Conjugación | DAR | Dosis ^[a] /vía/régimen | Número de ratones | TGI _{máx} (%) | TGD (%) |
|--------------|-----------------------|-----|-----------------------------------|-------------------|------------------------|---------|
| AB095 | - | n/a | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 0 | 0 |
| huAb3v2.5-CZ | A | 3,5 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 92 | 122 |
| huAb3v2.6-CZ | A | 3,4 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 93 | 130 |
| huAb3v2.9-CZ | A | 2,8 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 94 | 135 |
| huAb3v2.9-TX | E | 1,7 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 93 | 109 |
| huAb3v2.6-TX | E | 2,7 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 92 | 130 |
| huAb3v2.5-TX | E | 2,5 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 86 | 89 |

^[a] la dosis se administra en mg/kg/día

Tabla 24: Eficacia *in vivo* de los ADC anti-B7-H3 humanizados

| ADC | Método de Conjugación | DAR | Dosis ^[a] /vía/régimen | Número de ratones | TGI _{máx} (%) |
|----------------|-----------------------|-----|-----------------------------------|-------------------|------------------------|
| AB095 | - | n/a | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 0 |
| huAb3v2.5-AAA | E | 2,3 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 65 |
| huAb3v2.5-XW | E | 3,1 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 51 |
| huAb3v2.6-AAA | E | 3,5 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 47 |
| huAb3v2.6-XW | E | 4,0 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 43 |
| huAb13v1-AAA | E | 3,5 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 76 |
| huAb13v1-XW | E | 4,2 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 35 |
| huAb13v1-TX E2 | I | 2 | 6 mg/kg/IP/QDx1 | 8 | 88 |

^[a] la dosis se administra en mg/kg/día

El anticuerpo humanizado anti-B7-H3 huAb13v1 se conjugó con el inhibidor de Bcl-xL sintón WD y se evaluó en un modelo de xenoinjerto de cáncer de pulmón de células pequeñas B7-H3 positivo (H1650) como conjugado mediante el uso de los métodos descritos en el Ejemplo 7 y el Ejemplo 8. Como control, también se evaluó la actividad antitumoral *in vivo* de un anticuerpo igualado por isotipo IgG no específico (AB095). Los resultados se resumen en la Tabla 25.

Tabla 25: Eficacia *in vivo* del ADC anti-B7-H3 humanizado huAb13v1-WD en H1650

| ADC | DAR/Método de Conjugación | Dosis mg/kg/día | vía/régimen | TGI _{máx} (%) | TGD (%) |
|---|---------------------------|-----------------|-------------|------------------------|---------|
| AB095 ^(a) | N.A. | 10 | IP/QDx1 | 0 | 0 |
| huAb13v1-WD-E2 | 2/1 | 1 | IP/QDx1 | 46* | 47* |
| huAb13v1-WD-E2 | 2/1 | 3 | IP/QDx1 | 48* | 47* |
| huAb13v1-WD-E2 | 2/1 | 10 | IP/QDx1 | 62* | 77* |
| ^(a) mAb IgG1 * = p < 0,05 en comparación con el tratamiento control (AB095) ‡ = p < 0,05 en comparación con la pareja más activa en una combinación de fármacos N.A. = no se aplica | | | | | |

En contraste con la falta de actividad observada mediante el uso del anticuerpo IgG no dirigido con el mismo isotipo Ab095, los ADC de Bcl-xL dirigidos a B7-H3 exhibieron inhibición del crecimiento tumoral (TGI) y retraso del crecimiento tumoral (TGD), como se muestra en las Tablas 24 y 25, que refleja la administración dependiente de antígeno de los ADC dirigidos a B7-H3 que administran el inhibidor de Bcl-xL a las células tumorales que expresan B7-H3 en este modelo de xenoinjerto de ratón. Como control adicional, se evaluó la actividad antitumoral *in vivo* de los ADC que comprenden el anticuerpo no dirigido a MSL109 conjugado con los sintones inhibidores de Bcl-xL en el modelo de xenoinjerto del cáncer de pulmón de células pequeñas B7-H3 positivo (H1650). La actividad de estos ADC se comparó con la del anticuerpo con el mismo isotipo IgG no dirigido, AB095, como control. Como se muestra en la Tabla 26, los ADC que comprenden el anticuerpo no dirigido a MSL109 conjugado con los sintones inhibidores de Bcl-xL exhibieron una inhibición del crecimiento tumoral muy modesta y un retraso del crecimiento tumoral bajo o nulo. Por el contrario, los ADC de Bcl-xL dirigidos a B7-H3 (como se muestra en la Tabla 25) exhibieron una inhibición del crecimiento tumoral (TGI) y un retraso del crecimiento tumoral (TGD) mucho mayores, lo que refleja la entrega dependiente de antígeno de estos ADC a células que expresan B7-H3 en este modelo de xenoinjerto de ratón.

Tabla 26. Eficacia *in vivo* de los ADC inhibidores de BCL-xL no dirigidos (MSL109) en el modelo NCI-H1650 de NSCLC

| Tratamiento | Dosis ^[a] /vía/régimen | Inhibición del Crecimiento | |
|--|-----------------------------------|----------------------------|---------|
| | | TGI _{máx} (%) | TGD (%) |
| MSL109 [†] -H | 3/IP/Q4Dx6 | 18* | 0 |
| MSL109 [†] -H | 10/IP/Q4Dx6 | 43* | 20* |
| MSL109 [†] -H | 30/IP/Q4Dx6 | 8 | 0 |
| MSL109 [†] -CZ | 3/IP/Q4Dx6 | 29* | 0 |
| MSL109 [†] -CZ | 3/IP/Q7Dx6 | 18* | 0 |
| MSL109 [†] -CZ | 10/IP/Q4Dx6 | 32* | 16 |
| MSL109 [†] -CZ | 30/IP/Q4Dx6 | 32* | 12 |
| [†] Anticuerpo no dirigido ^[a] la dosis se administra en mg/kg/día * = p < 0,05 en comparación con el tratamiento control (AB095) Q4Dx6 indica una dosis cada 4 días para un total de 6 dosis | | | |

Ejemplo 22: Terapia de Combinación B7-H3

La actividad antitumoral de huAb13v1 como conjugados con CZ o TX como conjugados DAR2 (E2) purificados se caracterizó en modelos de xenoinjerto de cáncer de pulmón de células no pequeñas (H1650, H1299, H1975 y EBC1) de origen humano mediante el uso de los métodos descritos en el Ejemplo 8. La actividad antitumoral se evaluó como monoterapia y en combinación con docetaxel (H1650, H1299, H1975 y EBC1). Los resultados se presentan en la Tabla 27.

Tabla 27: Eficacia *in vivo* de los conjugados humanizados huAb13v1 anti-B7-H3 como monoterapia y en combinación con docetaxel

| ADC | DAR/Método de Conjugación | Dosis mg/kg/día | vía/régimen | TGI _{máx} (%) | TGD (%) |
|--|---------------------------|-----------------|-----------------------|------------------------|---------|
| EBC1 | | | | | |
| AB095 | - | 10 | Q4Dx6/IP | 0 | 0 |
| huAb13v1-TX E2 | 2/I | 10 | Q4Dx6/IP | 58 | 67 |
| Docetaxel | - | 7,5 | QDx1/IV | 85 | 80 |
| huAb13v1-TXE2 + Docetaxel | 2/I | 10+7,5 | Q4Dx6/IP + QDx1/IV | 140 | 140 |
| NCI-H1299 | | | | | |
| AB095 | - | 10 | Q4Dx6/IP | 0 | 0 |
| huAb13v1-TX E2 | 2/I | 10 | Q4Dx6/IP | 80 | 24 |
| Docetaxel | - | 7,5 | QDx1/IV | 87 | 48 |
| huAb13v1-TXE2 + Docetaxel | 2/I | 10+7,5 | Q4Dx6/IP + QDx1/IV | 97 | 83 |
| NCI-H1975 | | | | | |
| AB095 | - | 10 | Q4Dx6/IP | 0 | 0 |
| huAb13v1-TX E2 | 2/I | 10 | Q4Dx6/IP | 52 | 62 |
| Docetaxel | - | 7,5 | QDx1/IV | 81 | 77 |
| huAb13v1-TXE2 + Docetaxel | 2/I | 10+7,5 | Q4Dx6/IP + QDx1/IV | 92 | 108 |
| NCI-H1650 | | | | | |
| AB095 | - | 8 | Q7Dx6/IP | 0 | 0 |
| huAb13v1-CZ | 2/I | 10 | QDx1/IP | 80 | 100 |
| Docetaxel | - | 7,5 | QDx1/IV | 84 | 143 |
| huAb13v1-CZ + Docetaxel | - | 10+7,5 | QDx1/IP + QDx1/IV | 99 | > 600 |
| NCI-H1650 | | | | | |
| AB095(a) | N.A. | 10 | IP/Q14Dx3 | 0 | 0 |
| DTX | N.A. | 7,5 | IV/Q14Dx3 | 80* | 158* |
| huAb13v1-WD E2 | 2/I | 10 | IP/Q14Dx3 | 67* | 83* |
| huAb13v1-WD E2 + DTX | 2/I + N.A. | 10 + 7,5 | IP/Q14Dx3 + IV/Q14Dx3 | 98** | > 717** |
| huAb13v1-WD E2 | 2/I | 3 | IP/Q14Dx3 | 56* | 75* |
| huAb13v1-WD E2 + DTX | 2/I + N.A. | 3 + 7,5 | IP/Q14Dx3 + IV/Q14Dx3 | 99** | > 717** |
| huAb13v1-WD E2 | 2/I | 1 | IP/Q14Dx3 | 60* | 67* |
| huAb13v1-WD E2 + DTX | 2/I + N.A. | 1 + 7,5 | IP/Q14Dx3 + IV/Q14Dx3 | 88** | 467** |
| huAb13v1-AAA E2 | 2/I | 10 | IP/Q14Dx3 | 63* | 117* |
| huAb13v1-AAA E2 + DTX | 2/I + N.A. | 10 + 7,5 | IP/Q14Dx3 + IV/Q14Dx3 | 99** | > 717** |
| huAb13v1-AAA E2 | 2/I | 3 | IP/Q14Dx3 | 60* | 117* |
| huAb13v1-AAA E2 + DTX | 2/I + N.A. | 3 + 7,5 | IP/Q14Dx3 + IV/Q14Dx3 | 99** | > 717** |
| huAb13v1-AAA E2 | 2/I | 1 | IP/Q14Dx3 | 50* | 67* |
| huAb13v1-AAA E2 + DTX | 2/I + N.A. | 1 + 7,5 | IP/Q14Dx3 + IV/Q14Dx3 | 92** | > 717** |
| (a) mAb IgG1 | | | | | |
| * = p < 0,05 en comparación con el tratamiento control (AB095) | | | | | |
| ** = p < 0,05 en comparación con la pareja más activa en una combinación de fármacos | | | | | |
| N.A. = no se aplica | | | | | |

Los resultados presentados en la Tabla 27 demuestran que anteriormente, huAb13v1 como conjugados con CZ, TX, WD o AAA purificado con DAR2 (E2) inhibieron el crecimiento de los cuatro modelos de xenoinjerto de NSCLC como monoterapia. Además, huAb13v1 como conjugados con CZ, TX, WD o AAA purificado con DAR2 (E2) se combinó efectivamente con docetaxel para producir una inhibición más sostenida del crecimiento tumoral. Esto se ilustra más dramáticamente en el modelo de xenoinjerto H1650 donde la terapia de combinación resultó en un TGD de entre 467 % y > 717 %, mientras que las monoterapias individuales dieron como resultado TGD en el intervalo de 67 % - 158 %. Estos resultados apoyan la utilidad clínica de los ADC inhibidores de Bcl-xL (Bcl-xLi) que se dosifican en combinación con quimioterapia.

Resumen de la secuencia

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|---|--|
| 1 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb2 | QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKA SGYTF TSYWMH WVKQRPQGQGLEWIGMIHPD SGTTNYNEKFRS KATLTV DKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC AVYYGS TYWYFDV WGVTGTTTVTVSS |
| 2 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb2 | GYTFTSYWMH |
| 3 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb2 | MIHPD SGTTNYNEKFRS |
| 4 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb2 | YYGSTYWYFDV |
| 5 | Secuencia de aminoácidos de la VL de chAb2 | DVVM TQTPLSLPVS LGDAQAYISCR SSQSLV HINGNTYLH WYRQKPGQSPKLLIYK VSNRFS SGVPDRFSGSGSGTDFTLTKISRVEAEDLGVYFCSQS TH FPT EGSGTKLEIK |
| 6 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb2 | RSSQSLV HINGNTYLH |
| 7 | chAb2, chAb3, chAb10, huAb3VL.1, huAb3VL.1a, huAb3VL. Secuencia de aminoácidos 1b, huAb3v2.1, huAb3v2.2, huAb3v2.3, huAb3v2.4, huAb3v2.5, huAb3v2.6, huAb3v2.7, huAb3v2.8 y huAb3v2.9 VL CDR2 | KVSNRFS |
| 8 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb2 | SQSTHFPFT |
| 9 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb3 | QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKA SGYTF FSSYWMH WVKQRPQGQGLEWIGLIHPD SGSTNYNEMFKN KATLTV DRSSSTAYVQLSSLTSEDSAVYFC AGGGR LYFDY WGQGTTLTVSS |
| 10 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb3, huAb3VH.1, huAb3VH.1a, huAb3VH.1b, huAb3v2.1, huAb3v2.2, huAb3v2.3, huAb3v2.4, huAb3v2.5, huAb3v2.6, huAb3v2.7, huAb3v2.8, y huAb3v2.9 | GYTFSSYWMH |
| 11 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb3, huAb3VH.1, huAb3VH.1a y huAb3VH.1b | LIHPD SGSTNYNEMFKN |
| 12 | secuencia de aminoácidos de la VH de CDR3 chAb3, huAb3VH.1, huAb3VH.1a, huAb3VH.1b, huAb3v2.1, huAb3v2.2, huAb3v2.3, huAb3v2.4, huAb3v2.5, huAb3v2.6, huAb3v2.7, huAb3v2.8 y huAb3v2.9 | GGRLYFDY |
| 13 | secuencia de aminoácidos de la VL de chAb3 | DVVM TQTPLSLPVS LGDAQASISCR SSQSLV HSNGDTYLR WYLQKPGQSPKLLIYK VSNRFS SGVPDRFSGSGSGTDFTLKITRVEAEDLGVYFCSQS TH V PYTFGGGTKLEIK |
| 14 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb3, huAb3VL.1, huAb3VL.1a y huAb3VL.1b | RSSQSLV HSNGDTYLR |
| 15 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb3, huAb3VL.1, huAb3VL.1a, huAb3VL.1b, huAb3v2.1, huAb3v2.2, huAb3v2.3, huAb3v2.4, huAb3v2.5, huAb3v2.6, huAb3v2.7, huAb3v2.8 y huAb3v2.9 | SQSTHVPYT |
| 16 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb4 | QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKA SGYS F TSYWMH WVKQRPQGQGLEWIGMIHPNSGSNNYNEKFKS KATLTV DKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARRLGL HFDY WGQGTTLTVSS |
| 17 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb4 | GYSF TSYWMH |
| 18 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb4 | MIHPN SGSNNYNEKFKS |
| 19 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb4 | RLGLHFDY |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|---|---|
| 20 | secuencia de aminoácidos de la VL de chAb4 | DIVMTQSQKFMSTPVGDRVSITCK ASQNVGTAWAYQQKPGQSPKLLI Y SASNRYTGVPDRFTGSGSGTDF LTISNMQSEDLADYFCQQYSSYPY TEGGGTTKLEIK |
| 21 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb4 | KASQNVGTAVA |
| 22 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VL de chAb4 | SASNRYT |
| 23 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb4 | QQYSSYPY |
| 24 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb18 | QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKA SGYSFTSYTIHWVKQRPGGLEW GYINPNSRNTDYNQKFKDETTLTA DRSSSTAYMQLISLTSEDSAVYYC ARYSGSTPYWYFDVWGAGTTVTVS S |
| 25 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb18, huAb18VH.1, huAb18VH.1a y huAb18VH.1b | GYSFTSYTIH |
| 26 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb18, huAb18VH.1 y huAb18VH.1a | YINPNSRNTDYNQKFKD |
| 27 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb18, huAb18VH.1, huAb18VH.1a y huAb18VH.1b | YSGSTPYWYFDV |
| 28 | secuencia de aminoácidos de la VL de chAb18 | QIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCR ASSSVSYMNWYQQKPGSSPKPWIY ATSNLASGVPARFSVSVSGTSHSL TISRVEAEDAATYYCQQWSSNPLT FGAGTKLELK |
| 29 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb18, huAb18VL.1, huAb18VL.1a, huAb18VL.1b, huAb18VL.2 y huAb18VL.2a | RASSSVSYMN |
| 30 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VL de chAb18, huAb18VL.1, huAb18VL.1a, huAb18VL.1b, huAb18VL.2 y huAb18VL.2a | ATSNLAS |
| 31 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb18, huAb18VL.1, huAb18VL.1a, huAb18VL.1b, huAb18VL.2 y huAb18VL.2a | QQWSSNPLT |
| 32 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb13 | DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTV TGYSITSGYSWHWIRQFPGNKLEW MGYIHSSGSTNYPNPSLKSRISINR DTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYC AGYDDYFEYWGQGTTLTVSS |
| 33 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb13, huAb13Vh.1, huAb13Vh.1a, huAb13Vh.1b, huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8 y huAb13v9 | GYSITSGYSWH |
| 34 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb13, huAb13Vh.1, huAb13Vh.1a, huAb13Vh.1b, huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8 y huAb13v9 | YIHSSGSTNYPNPSLKSRISINR |
| 35 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb13, huAb13Vh.1, huAb13Vh.1a, huAb13Vh.1b, huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8 y huAb13v9 | YDDYFEY |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|---|--|
| 36 | secuencia de aminoácidos de la VL de chAb13 | DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCK ASQNVGFNVA WYQQKPGQSPKALI Y SASYRYS GVDPDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSEDLAEYFC QQYNSYPF TFGSGTKLEIK |
| 37 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb13, huAb13VL.1, huAb13VL.1a, huAb13VL.1b, huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8 y huAb13v9 | KASQNVGFNVA |
| 38 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VL de chAb13, huAb13VL.1, huAb13VL.1a, huAb13VL.1b, huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8 y huAb13v9 | SASYRYS |
| 39 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de huAb13VL.1, huAb13VL.1a, huAb13VL.1b, huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8 y huAb13v9 | QQYNWYPFT |
| 40 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb12 | EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAA SGFTFSSYAMS WVRQTPEKRLEWV ATISSGTNYTYYPDSVKG RFTISR DNAKNLTLYLQMTSLRSEDAMYCYC ARQGRYSWIAY WGQGTSLVTVSA |
| 41 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb12 | GFTFSSYAMS |
| 42 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb12 | TISSGTNYTYYPDSVKG |
| 43 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb12 | QGRYSWIAY |
| 44 | secuencia de aminoácidos de la VL de chAb12 | DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR ASKSVSTSDYSYMH WNQQKPGQPP KLLIY LASNLES GVPARFSGSGSG TDFTLNHPVEEEDAATYYC QHSR ELLTFGAGTKLELK |
| 45 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb12 | RASKSVSTSDYSYMH |
| 46 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VL de chAb12 y chAb17 | LASNLES |
| 47 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb12 | QHSRELLT |
| 48 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb14 | EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAA SGFTFSSYGMS WVRQTPEKRLEWV ATISGGGTNTYYPDSVEG RFTISR DNAKNFLYLQMSSLRSEDALYYC ARHYGSQTMDY WGQGTSLVTVSS |
| 49 | Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb14 y chAb8 | GFTFSSYGMS |
| 50 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb14 | TISGGGTNTYYPDSVEG |
| 51 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb14 | HYGSQTMDY |
| 52 | secuencia de aminoácidos de la VL de chAb14 | DIQMTQSPASLSASVGETVTITCR TSGNIHNYLT WYQQKQKSPQLLV Y NAKTLAD GVPSRFSGSGSGTQFS LKINSLQPEDFGSYCYC QHFSIMW TFGGGTKLEIK |
| 53 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb14 | RTSGNIHNYLT |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|--|--|
| 54 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VL de chAb14 | NAKTLAD |
| 55 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb14 | QHFWSIMWT |
| 56 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb6 | QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKA TGYTFSRYWIEWVKQRPGHGLEWI GEILPGSGSTNYNEKFKGKATFTA DTSSNTAYMQVSSLTSEDSAVHYC ARRGYGYVPYALDYGQGTSTVTVS S |
| 57 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb6 | GYTFSRYWIE |
| 58 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb6 | EILPGSGSTNYNEKFKG |
| 59 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb6 | RGYGYVPYALDY |
| 60 | Secuencia de aminoácidos de la VL de chAb6 | EIQMTQTSSLSASLGDRVTISCR ASQDISNSLNWYQQKPDGTVNLLI YYTSRLYSGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY TFGGGTKLEIK |
| 61 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb6 | RASQDISNSLN |
| 62 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VL de chAb6 | YTSRLYS |
| 63 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb6 | QQGNTLPYT |
| 64 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb11 | EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAT SGFTFTNYYSWVRQPPGKALEWL GFIRNKANDYTTEYSASVKGRFTI SRDNSQSILYLQMNTRLAEDSATY YCARESPGNPFAYWGQGLTVTVSA |
| 65 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb11 | GFTFTNYYS |
| 66 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb11 | FIRNKANDYTTEYSASVKG |
| 67 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb11 | ESPGNPFAY |
| 68 | secuencia de aminoácidos de la VL de chAb11 | DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMTCK SSQSLNLSGTQKNFLTWYQQKPGQ PPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSG SGTDFTLTISSVQAEDLAVYFCQN DYIYPLTFGAGTKLELK |
| 69 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb11 | KSSQSLNLSGTQKNFLT |
| 70 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VL de chAb11 | WASTRES |
| 71 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb11 | QNDIYPLT |
| 72 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb16 | EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAA SGFDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWI GEINPDSSTINYTPSLKDKFIISR DNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYC ARPGFGNYIYAMDYWGQGTSTVTVS S |
| 73 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb16 | GFDDFSRYWMS |
| 74 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 d la VH de chAb16 | EINPDSSTINYTPSLKD |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|---|---|
| 75 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb16 | PGFGNYIYAMDY |
| 76 | secuencia de aminoácidos de la VL de chAb16 | DIQMTQTTSLSASLGDRVTINCR ASQDISNFLN WYQQKPDGTVKLLI YYTSRLYLGVPSRFGSGSGTDYS LTISNLEQEDIATYFC QQGNTLPP TFGGGTKLEIK |
| 77 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb16 | RASQDISNFLN |
| 78 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VL de chAb16 | YTSRLYL |
| 79 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb16 | QQGNTLPPT |
| 80 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb10 | DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTV T GYSITSDYAWN WIRQFPGNRLEW MGHINYSGITNYP SLKSRISITR DTSKNQFFLQLYSVTTEDTATYFC ARR SLFYYYGSSLYAMDY WGQGTST VTVSS |
| 81 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb10 | GYSITSDYAWN |
| 82 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb10 | HINYSGITNYP SLKS |
| 83 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb10 | RSLFYYYGSSLYAMDY |
| 84 | secuencia de aminoácidos de la VL de chAb10 | DVVMTQSPFSLPVS LGDQASISCR SSQSLVHSNGNTYL HWYLQKPGQS PKLLIY KVSNRFS GVDPDRFGSGS GTDFTLKISRVEAEDLGVYFC SQS THVPWT FGGGTKLEIK |
| 85 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 d la VL de chAb10 | RSSQSLVHSNGNTYLH |
| 86 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb10 | SQSTHVPWT |
| 87 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb7 | EVQLVESGENLVKPGGSLKLSCAA SGF SFRGYGMSWVRQTPDKRLEWV AAISTGGNYTYPDSVQ GREFTISR DNANNTLYLQMSLKSEDTAMYIC ARR GGNYAGFAY WGQGLTVSA |
| 88 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb7 VH CDR1 | GFSFRGYGMS |
| 89 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb7 | AISTGGNYTYPDSVQG |
| 90 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb7 | RGGNYAGFAY |
| 91 | secuencia de aminoácidos de la VL de chAb7 | DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCR PSENIYSNLA WYQQKQKSPQLLV Y AATNLAD GVPSRFGSGSGTQYS LKINSLQSEDFGTYYC QHFWGTPF TFGSGTKLEIK |
| 92 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb7 | RPSENIYSNLA |
| 93 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VL de chAb7 y chAb8 | AATNLAD |
| 94 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb7 | QHFWGTPFT |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|--|--|
| 95 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb8 | EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAA SGFTFSSYGMS WVRQTPEKRLEWV ATISGGGNYTYCPDSV KGR FTISR DNAKNNLYLQMSSLRSEDALYYC TR Q RGYDYHYAMDFWGQGTSVTVS S |
| 96 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb8 | TISGGGNYTYCPDSVKG |
| 97 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb8 | QRGYDYHYAMDF |
| 98 | Secuencia de aminoácidos de la VL de chAb8 | DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCR ASENIYSNL AWHQQKQKSPQLLV Y AATNL ADGVPSRFSGNGSDTQYS LKINSLQSEDFGSYFC Q NFWGTSW TFGGGTKLEIK |
| 99 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb8 | RASENIYSNLA |
| 100 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb8 | QNFWGTSWT |
| 101 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb17 | EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA SGFTFSSYIMS WVRQTPEKRLEWV ASIVSSNITYYPDSMKGR FTISR NARNILYLQMSSLKSEDTAMYYCA R SGTRAWFAY WGQGTTLVTVSA |
| 102 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 d la VH de chAb17 | GFTFSSYIMS |
| 103 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb17 | SIVSSNITYYPDSMKG |
| 104 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb17 | SGTRAWFAY |
| 105 | secuencia de aminoácidos de la VL de chAb17 | DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR ASKSVSTSA SYMHWYQQKPGQPP KLLIY LASNLES GVPARFSGSGSG TDFTLNIHPVEEEDAATYYC QHSR ELPYTFGGGTKLEIK |
| 106 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb17 | RASKSVSTSA SYMH |
| 107 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb17 | QHSRELPLYT |
| 108 | secuencia de aminoácidos de la VH de chAb5 | QVQLQQPGDELVKPGASVKLSCKT SGYTFTTDWMH WVKQRPQGGLWV GMIHPNSGTTNYNEKFKS KAALTV DKSSSTACMQLSSLTSEDSAVYYC AR SYWKWYFDV WGTTTITVSS |
| 109 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb5 | GYTFTTDWMH |
| 110 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb5 | MIHPNSGTTNYNEKFKS |
| 111 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb5 | SYWKWYFDV |
| 112 | secuencia de aminoácidos de la VL de chAb5 | QIVLTQSPAIMSASLGEEITLTCS ASSSVSYM HWYQQKSGTSPKLLIY STSNLAS GVPSRFSGSGSGTFYSL TISSVEAEDSADYYC HQWTSYMYT FGGGTKLEIK |
| 113 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb5 | SASSSVSYMH |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|--|--|
| 114 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VL de chAb5 | STSNLAS |
| 115 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb5 | HQWTSYMYT |
| 116 | secuencia de aminoácidos de la VH de huAb18VH.1, huAb18v1 y huAb18v5 | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYSFTSYTIHWVRQAPGQGLEWM GYINPNSRNTDYNQKFKDRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYSGSTPYWYFDVWGQGTITVTS S |
| 117 | secuencia de aminoácidos de la VH de huAb18VH.1a, huAb18v3, huAb18v8 y huAb18v9 | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYSFTSYTIHWVRQAPGQGLEWI GYINPNSRNTDYNQKFKDRITTLTA DRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYSGSTPYWYFDVWGQGTITVTS S |
| 118 | secuencia de aminoácidos de la VH de huAb18VH.1b, huAb18v2, huAb18v4, huAb18v6, huAb18v7 y huAb18v10 | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYSFTSYTIHWVRQAPGQGLEWM GYINPNSRNTDYAQKFGQGRVTLTA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYSGSTPYWYFDVWGQGTITVTS S |
| 119 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de huAb18VH.1b | YINPNSRNTDYAQKFGQ |
| 120 | secuencia de aminoácidos de la VL de huAb18VL.1, huAb18v1 y huAb18v2 | DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASSSVSYMNWYQQKPGKAPKLLIY ATSNLASGVPSRFSVSGSGTEFTL TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPLT FGQGTKLEIK |
| 121 | secuencia de aminoácidos de la VH de huAb18VL.1a, huAb18v3 y huAb18v4 | DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASSSVSYMNWYQQKPGKSPKPIY ATSNLASGVPSRFSVSVSGTEHTL TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPLT FGQGTKLEIK |
| 122 | secuencia de aminoácidos de la VL de huAb18VL.1b, huAb18v8 y huAb18v10 | DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASSSVSYMNWYQQKPGKAPKPIY ATSNLASGVPSRFSVSGSGTEHTL TISSLQPEDFATYYCQQWSSNPLT FGQGTKLEIK |
| 123 | secuencia de aminoácidos de la VL de huAb18VL.2, huAb18v5 y huAb18v6 | EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCR ASSSVSYMNWYQQKPDQSPKLLIK ATSNLASGVPSRFSVSGSGTDFTL TINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLT FGQGTKLEIK |
| 124 | secuencia de aminoácidos de la VL de huAb18VL.2a, huAb18v7 y huAb18v9 | EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCR ASSSVSYMNWYQQKPDQSPKPIY ATSNLASGVPSRFSVSVSGTDHTL TINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLT FGQGTKLEIK |
| 125 | secuencia de aminoácidos de la VH de huAb3VH.1, huAb3v1 y huAb3v4 | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWM GLIHPSGSGTNYNEMFKNRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARGGRLYFDYWGQGTITVTVSS |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|--|--|
| 126 | secuencia de aminoácidos de la VH de huAb3VH.1a, huAb3v3 y huAb3v6 | EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPDSSGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYVELSSLRSED TAVYFC AGGGRLYFDYWGQGT TTVTVSS |
| 127 | secuencia de aminoácidos de la VH de huAb3VH.1b, huAb3v2 y huAb3v5 | EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPDSSGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYMELSSLRSED TAVYYC AGGGRLYFDYWGQGT TTVTVSS |
| 128 | secuencia de aminoácidos de la VL de huAb3VL.1, huAb3v1 y huAb3v2 | DIVMTQSPLSLPVTPEGEPASISCR SSQSLVHSNGD TYLRWYLQKPGQS PQLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQS THVPYTFGGG TKVEIK |
| 129 | secuencia de aminoácidos de la VL de huAb3VL.1a y huAb3v3 | DVVM TQSPLSLPVTPEGEPASISCR SSQSLVHSNGD TYLRWYLQKPGQS PQLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYFC S QS THVPYTFGGG TKVEIK |
| 130 | secuencia de aminoácidos de la VL de huAb3VL.1b, huAb3v4, huAb3v5 y huAb3v6 | DVVM TQSPLSLPVTPEGEPASISCR SSQSLVHSNGD TYLRWYLQKPGQS PQLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQS THVPYTFGGG TKVEIK |
| 131 | secuencia de aminoácidos de la VH de huAb3v2.1, huAb3v2.2 y huAb3v2.3 | EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPWSGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYMELSSLRSED TAVYYC AGGGRLYFDYWGQGT TTVTVSS |
| 132 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de huAb3v2.1, huAb3v2.2 y huAb3v2.3 | LIHPWSGSTNYNEMFKN |
| 133 | secuencia de aminoácidos de la VL de huAb3v2.1, huAb3v2.4 y huAb3v2.7 | DIVMTQSPLSLPVTPEGEPASISCR SSQSLVHSNGD TYLRWYLQKPGQS PQLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQS THVPYTFGGG TKVEIK |
| 134 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de huAb3v2.1, huAb3v2.4 y huAb3v2.7 | RSSQSLVHSNGD TYLR |
| 135 | secuencia de aminoácidos de la VL de huAb3v2.2, huAb3v2.5 y huAb3v2.8 | DIVMTQSPLSLPVTPEGEPASISCR SSQSLVHSNRD TYLRWYLQKPGQS PQLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQS THVPYTFGGG TKVEIK |
| 136 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de huAb3v2.2, huAb3v2.5 y huAb3v2.8 | RSSQSLVHSNRD TYLR |
| 137 | secuencia de aminoácidos de la VL de huAb3v2.3, huAb3v2.6 y huAb3v2.9 | DIVMTQSPLSLPVTPEGEPASISCR SSQSLVHSNQD TYLRWYLQKPGQS PQLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQS THVPYTFGGG TKVEIK |
| 138 | secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de huAb3v2.3, huAb3v2.6 y huAb3v2.9 | RSSQSLVHSNQD TYLR |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|--|---|
| 139 | secuencia de aminoácidos de la VH de huAb3v2.4, huAb3v2.5 y huAb3v2.6 | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWIGLIHPESGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYMELSSLRSED TAVYYC AGGGRLYFDYWGQGT TTVTVSS |
| 140 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de huAb3v2.4, huAb3v2.5 y huAb3v2.6 | LIHPESGSTNYNEMFKN |
| 141 | secuencia de aminoácidos de la VH de huAb3v2.7, huAb3v2.8 y huAb3v2.9 | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWIGLIHPISGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYMELSSLRSED TAVYYC AGGGRLYFDYWGQGT TTVTVSS |
| 142 | secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de huAb3v2.7, huAb3v2.8 y huAb3v2.9 | LIHPISGSTNYNEMFKN |
| 143 | secuencia de aminoácidos de la VL de huAb13VL.1, huAb13v2, huAb13v5 y huAb13v7 | |
| 144 | secuencia de aminoácidos de la VL de huAb13VL.1a, huAb13v1, huAb13v3 y huAb13v8 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNWYPF TFGQGTKLEIK DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKSPKALI YSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFAEYFCQQYNWYPF TFGQGTKLEIK DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYFCQQYNWYPF TFGQGTKLEIK |
| 145 | secuencia de aminoácidos de la VL de huAb13VL.1b, huAb13v4, huAb13v6 y huAb13v9 | |
| 146 | secuencia de aminoácidos de la VH de huAb13VH.1, huAb13v2, huAb13v3 y huAb13v4 | EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAV SGYSITSGYSWHWIRQPPGKGLEW IGYIHSSGSTNYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYFEYWGQGT TTVTVSS |
| 147 | secuencia de aminoácidos de la VH de huAb13VH.1a, huAb13v1, huAb13v5 y huAb13v6 | EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAV TGYSITSGYSWHWIRQFPNGLEW MGYIHSSGSTNYNPSLKSRTISIR DTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYC AGYDDYFEYWGQGT TTVTVSS |
| 148 | secuencia de aminoácidos de la VH de huAb13VH.1b, huAb13v7, huAb13v8 y huAb13v9 | EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAV SGYSITSGYSWHWIRQPPGNGLEW MGYIHSSGSTNYNPSLKSRTITISR DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYFEYWGQGT TTVTVSS |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|---|--|
| 149 | Secuencia de aminoácidos de B7-H3 (humana) | MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFC LTGALEVQVPEDPVVALVGTDATL CCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDT KQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALF PDLLAQGNASLRLQVRVVADEGSF TCFVSIRDGSAASVSLQVAAPYSK PSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSY QGYPEAEVFWQDQGQVPLTGNVTT SQMANEQGLFDVHSILRVVLGANG TYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQ RSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTD TLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLT DTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTA LFPDLLAQGNASLRLQVRVVADEG SFTCFVSIRDGSAASVSLQVAAPY SKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCS SYRGYPEAEVFWQDQGQVPLTGNV TTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGA NGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTIT GQPMTFPPEALWTVGLSVCLIAL LVALAFVCWRKIKQSCEENAGAE DQDGEGEKSKTALQPLKHSKSDKED DGQEIA |
| 150 | B7-H3-ECD humano (fusión fc) Nota: la secuencia Fc está subrayada | MLRRRGSPGMGVHVGAAALGALWFC LTGALEVQVPEDPVVALVGTDATL CCSFSPPEPGFSLAQLNLIWQLTDT KQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALF PDLLAQGNASLRLQVRVVADEGSF TCFVSIRDGSAASVSLQVAAPYSK PSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSY QGYPEAEVFWQDQGQVPLTGNVTT SQMANEQGLFDVHSILRVVLGANG TYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQ RSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTD TLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLT DTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTA LFPDLLAQGNASLRLQVRVVADEG SFTCFVSIRDGSAASVSLQVAAPY SKPSMTLEPNKDLRPGDVTITCS SYRGYPEAEVFWQDQGQVPLTGNV TTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGA NGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTIT GQPMTFAAADKTHTCPPCPAPEAE <u>GAPSVFLFPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE</u> <u>VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT</u> <u>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP</u> <u>IEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSR</u> <u>EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV</u> <u>EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS</u> <u>FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV</u> <u>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u> |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|---|--|
| 153 | B7-H3-ECD de ratón (marcado con his) | MEFGLSWLFLVAILKGVQCVEVQV SEDPVVALVDTDATLRCSFSPEPG FSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTE GRDQGSAYSNRALTALFPDLLVQNA SLRLQVRVVTDEGSYTCFVSIQDF DSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNK DLRPGNMVTITCSSYQGYPEAEVF WKDGQGVPLTGNVTTSQMANERGL FDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNP VLQQDAHGSVTITGQPLTFHHHHH H |
| 154 | B7-H3-ECD de Cynomolgus (marcado con his) | MLHRRGSPGMGVHVGAAALGALWFC LTGALEVQVPEDPVVALVGTDTATL RCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDT KQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALF LDLLAQGNASRLRLQVRVADEGSF TCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSK PSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSY RGYPEAEVFWQDGQGAPLTGNVTT SQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANG TYSCLVRNPVLQQDAHGSITITPQ RSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDA TLRCSF SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLV HSFTEGRDQGSAYANRTALFLDLL AQGNASRLRLQVRVADEGSFTCFV SIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMT LEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYP EAEVFWQDGQGAPLTGNVTTSQMA NEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYS CLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTF AAAAHHHHHHHH |
| 155 | Secuencia de aminoácidos de IGHV1-69*06 | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCA SGGTFSYAISSWRQAPGQGLEWM GGIIPITFGTANYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AR |
| 156 | Secuencia de aminoácidos de IGHJ6*01 | WGQGTTTVTVSS |
| 157 | Secuencia de aminoácidos de IGKV1-9*01 | DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCR ASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFT LTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPF |
| 158 | Secuencia de aminoácidos de IGKJ2*01 | FGQGTKLEIK |
| 159 | Región constante de Ig gamma-1 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|--|--|
| 160 | Mutante de la región constante de Ig gamma-1 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK |
| 161 | Región constante de Ig Kappa | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTL TLISKADYEKKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC |
| 162 | Región constante de Ig Lambda | QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKAT LVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV KAGVETTTPSKQSNKYAASSYLS LTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS |
| 163 | Secuencia de aminoácidos de IGKV6-21*01 | EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCR ASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLI KYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFT LTINSLEAEDAATYYCHQSSSLPX |
| 164 | Secuencia de aminoácidos de IGKV2-28*01 | DIVMTQSPSLPVTTPGEPASISCR SSQSLHLSNGYNYLDWYLQKPGQS PQLLIYLGSRASGVDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQA LQTPP |
| 165 | Secuencia de aminoácidos de IGKJ4*01 | FGGGTKVEIK |
| 166 | Secuencia de aminoácidos de IGHV-b*01(0-1) | QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCAV SGYSISSGYWGWIRQPPGKGLEW IGSIYHSGSTYYNPSLKSRTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC AR |
| 167 | Secuencia de aminoácidos de IGKv1-39*01 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPP |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|---|---|
| 168 | Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de huAb13v1 Nota: la secuencia mutante de la región constante de Ig gamma-1 está subrayada. | EVQLQESGPGGLVKPSETLSLTCAV TGYSITSGYSWHWIRQFPNGLEW MGYIHSSGSTNYNPSLKSRLSISR DTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYC AGYDDYFEYWGQGT ^T TVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALH NHYTQKSLSLSPGK |
| 169 | Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de huAb13v1 Nota: la secuencia de la región constante de Ig kappa está subrayada. | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKSPKALI YSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFAEYFCQQYNWYPF TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFI FPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC |
| 170 | Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de huAb3v2.5 Nota: la secuencia mutante de la región constante de Ig gamma-1 está subrayada. | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPESGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AGGGRLYFDYWGQGT ^T TVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLSPGK |
| 171 | Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de huAb3v2.5 Nota: la secuencia de la región constante de Ig kappa está subrayada. | DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISCR SSQSLVHSNRDYLRLWLQKPGQS PQLLIYKVSNRFSGPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQS THVPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSV FI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|---|--|
| 172 | Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de huAb3v2.6 Nota: la secuencia mutante de la región constante de Ig gamma-1 está subrayada. | EVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPESGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAGGGRLYFD YWGQGT'TVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLT'VLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK |
| 173 | Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de huAb3v2.6 Nota: la secuencia de la región constante de Ig kappa está subrayada. | DIVMTQSPLSLPVT'PGEPAISICR SSQSLVHSNQD'TYLRWYLQKPGQS PQLLIYKVS'NRFS'GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQS THVPYTFGGGT'KVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDS'TYLS'SLTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVT'KSFNR GEC |
| 174 | Secuencia de aminoácidos de IGHV1-69*06_I'GHJ6 | QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKA SGGT'FSSY'AI'SWVRQAPGQGLEWM GGI'IPIFGTANYA'QKFQGRVT'ITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARXXXXXXXXXWGQGT'TVTVSS |
| 175 | Secuencia de aminoácidos de IGKV2-28*01_I'GKJ4 | DIVMTQSPLSLPVT'PGEPAISICR SSQSL'LLHSNG'NYLDWYLQKPGQS PQLLIYLG'SNRAS'GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCXXX XXXXXXF'GGGT'KVEIK |
| 176 | Secuencia de aminoácidos de IGHV4-b_I'GHJ6 | QVQLQESGPG'LVKPS'ETLSLTCAV SGYSISSGYW'GWIRQPPGKGLEW IGSIYHSGSTYYNPSL'KSRVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARXXXXXXXXXWGQGT'TVTVSS |
| 177 | Secuencia de aminoácidos de IGKV1-39_I'GKJ2 | DIQMTQSPSSLSASV'GDRVTITCR ASQSISSYLNWYQ'QKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSR'FSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCXXXXXXXXX XFGQGT'KLEIK |
| 178 | Secuencia de aminoácidos de las variantes de huAb3 VL1 Nota: X puede ser cualquier aminoácido excepto: M, C, N, D o Q | DIVMTQSPLSLPVT'PGEPAISICR SSQSLVHSXGD'TYLRWYLQKPGQS PQLLIYKVS'NRFS'GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQS THVPYTFGGGT'KVEIK |

| SEQ ID NO: | Descripción | Secuencia de Aminoácidos |
|------------|---|--|
| 179 | Secuencia de aminoácidos de las variantes de huAb3 VL1 Nota: X puede ser cualquier aminoácido excepto: M, C, G, S, N o P | DIVMTQSPVLSLPVTPGEPASISCR SSQSLVHSNXDTYLRWYLQKPGQS PQLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQS THVPYTFGGGTKVEIK |
| 180 | Secuencia de aminoácidos de las variantes de huAb3 VH1b Nota: X puede ser cualquier aminoácido excepto: M, C, N, D o Q | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPXSGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AGGGRLYFDYWGQGTITVTVSS |
| 181 | Secuencia de aminoácidos de las variantes de huAb3 VH1b Nota: X puede ser cualquier aminoácido excepto: M, C, G, S, N o P | EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPDXGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AGGGRLYFDYWGQGTITVTVSS |
| 182 | secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb13 | QQYNSYPFT |

Listado de secuencias

<110> ABBVIE INC. BRUNCKO, MILÁN

<120> ANTICUERPOS ANTI-B7-H3 Y CONJUGADOS ANTICUERPO-FÁRMACO

<130> 117813-12620

<140>

<141>

<150> US 62/347,476

<151> 2016-06-08

<150> US 62/366,511

<151> 2016-07-25

<160> 182

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb2

<400> 1

ES 2 861 499 T3

| | | |
|-----|--|-------------|
| | Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala | 1 5 10 15 |
| 5 | Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr | 20 25 30 |
| 10 | Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile | 35 40 45 |
| 15 | Gly Met Ile His Pro Asp Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe | 50 55 60 |
| 20 | Arg Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr | 65 70 75 80 |
| 25 | Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys | 85 90 95 |
| 30 | Ala Val Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr | 100 105 110 |
| 35 | Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser | 115 120 |
| 40 | <210> 2 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia Artificial | |
| 45 | <220> <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb2 | |
| 50 | <400> 2 | |
| 55 | Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His | 1 5 10 |
| 60 | <210> 3 <211> 17 <212> PRT <213> Secuencia Artificial | |
| 65 | <220> <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb2 | |
| 70 | <400> 3 | |
| 75 | Met Ile His Pro Asp Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Arg | 1 5 10 15 |
| 80 | Ser | |
| 85 | <210> 4 <211> 11 <212> PRT <213> Secuencia Artificial | |
| 90 | <220> <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb2 | |
| 95 | <400> 4 | |
| 100 | Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Trp Tyr Phe Asp Val | 1 5 10 |

<210> 5
 <211> 112
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb2
 10 <400> 5

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

 <210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb2
 45 <400> 6

 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ile Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 50 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de chAb2, chAb3, chAb10, huAb3VL.1,
 huAb3VL.1a, huAb3VL.1b, huAb3v2.1, huAb3v2.2, huAb3v2.3, huAb3v2.4, huAb3v2.5, huAb3v2.6, huAb3v2.7,
 huAb3v2.8, y huAb3v2.9
 <400> 7
 60 Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5
 65 <210> 8
 <211> 9
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb2

5

<400> 8

Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Phe Thr
1 5

10

<210> 9
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb3

<400> 9

20

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

25

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

35

Gly Leu Ile His Pro Asp Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60

40

Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

45

Val Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

50

Ala Gly Gly Gly Arg Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

55

Leu Thr Val Ser Ser
115

60

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

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb3, huAb3VH.1, huAb3VH.1a, huAb3VH.1b, huAb3v2.1, huAb3v2.2, huAb3v2.3, huAb3v2.4, huAb3v2.5, huAb3v2.6, huAb3v2.7, huAb3v2.8, y huAb3v2.9

<400> 10

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met His
1 5 10

65

<210> 11
<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb3, huAb3VH.1, huAb3VH.1a, y huAb3VH.1b

<400> 11

10 Leu Ile His Pro Asp Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe Lys
1 5 10 15

Asn

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb3, huAb3VH.1, huAb3VH.1a, huAb3VH.1b, huAb3v2.1, huAb3v2.2, huAb3v2.3, huAb3v2.4, huAb3v2.5, huAb3v2.6, huAb3v2.7, huAb3v2.8, y huAb3v2.9

<400> 12

25 Gly Gly Arg Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb3

<400> 13

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

45 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

50 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

60 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb3, huAb3VL.1, huAb3VL.1a, y huAb3VL.1b
 5
 <400> 14
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Arg
 1 5 10 15
 10
 <210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb3, huAb3VL.1, huAb3VL.1a, huAb3VL.1b, huAb3v2.1, huAb3v2.2, huAb3v2.3, huAb3v2.4, huAb3v2.5, huAb3v2.6, huAb3v2.7, huAb3v2.8, y huAb3v2.9
 20
 <400> 15
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr
 1 5
 25
 <210> 16
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb4
 <400> 16
 35 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 40 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 45 Gly Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 50 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 55 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 60 Ala Arg Arg Leu Gly Leu His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser
 115
 65
 <210> 17
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb4

 <400> 17

 10 Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp Met His
 1 5 10

 <210> 18
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb4

 20 <400> 18

 Met Ile His Pro Asn Ser Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

 25 Ser

 <210> 19
 <211> 8
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb4
 35
 <400> 19

 Arg Leu Gly Leu His Phe Asp Tyr
 1 5
 40
 <210> 20
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb4

 <400> 20
 50

 55

 60

 65

ES 2 861 499 T3

| | | |
|----|---|--|
| | Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Pro Val Gly | |
| | 1 5 10 15 | |
| 5 | Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala | |
| | 20 25 30 | |
| 10 | Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile | |
| | 35 40 45 | |
| 15 | Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly | |
| | 50 55 60 | |
| 20 | Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Met Gln Ser | |
| | 65 70 75 80 | |
| 25 | Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr | |
| | 85 90 95 | |
| 30 | Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys | |
| | 100 105 | |
| 35 | <210> 21 | |
| | <211> 11 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 40 | <220> | |
| | <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb4 | |
| 45 | <400> 21 | |
| | Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala | |
| | 1 5 10 | |
| 50 | <210> 22 | |
| | <211> 7 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 55 | <220> | |
| | <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de chAb4 | |
| 60 | <400> 22 | |
| | Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr | |
| | 1 5 | |
| 65 | <210> 23 | |
| | <211> 9 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 70 | <220> | |
| | <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb4 | |
| 75 | <400> 23 | |
| | Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr | |
| | 1 5 | |
| 80 | <210> 24 | |
| | <211> 121 | |

ES 2 861 499 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb18

<400> 24

```

10      Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Ala Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
      1          5          10          15

      Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
      20          25          30

15      Thr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35          40          45

20      Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Ser Arg Asn Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe
      50          55          60

25      Lys Asp Glu Thr Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
      65          70          75          80

      Met Gln Leu Ile Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
      85          90          95

30      Ala Arg Tyr Ser Gly Ser Thr Pro Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
      100          105          110

35      Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115          120

```

<210> 25

<211> 10

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb18, huAb18VH.1, huAb18VH.1a, y huAb18VH.1b

<400> 25

```

50      Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Thr Ile His
      1          5          10

```

<210> 26

<211> 17

55 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb18, huAb18VH.1, y huAb18VH.1a

<400> 26

```

65      Tyr Ile Asn Pro Asn Ser Arg Asn Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
      1          5          10          15

      Asp

```


<210> 27
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de chAb18, huAb18VH.1, huAb18VH.1a, y huAb18VH.1b VH CDR3
 10 <400> 27

Tyr Ser Gly Ser Thr Pro Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

 15 <210> 28
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb18

 <400> 28

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Val Ser
 50 55 60

Val Ser Gly Thr Ser His Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

 50 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb18, huAb18VL.1, huAb18VL.1a, huAb18VL.1b, huAb18VL.2, y huAb18VL.2a

 <400> 29
 60

Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn
 1 5 10

 65 <210> 30
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de chAb18, huAb18VL.1, huAb18VL.1a, huAb18VL.1b, huAb18VL.2, y huAb18VL.2a

<400> 30

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb18, huAb18VL.1, huAb18VL.1a, huAb18VL.1b, huAb18VL.2, y huAb18VL.2a

<400> 31

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
1 5

<210> 32

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb13

<400> 32

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
35 40 45

Met Gly Tyr Ile His Ser Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Asn Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Gly Tyr Asp Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb13, huAb13Vh.1, huAb13Vh.1a, huAb13Vh.1b, huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8, y huAb13v9
 5
 <400> 33
 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Trp His
 1 5 10
 10
 <210> 34
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb13, huAb13Vh.1, huAb13Vh.1a, huAb13Vh.1b, huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8, y huAb13v9
 20
 <400> 34
 Tyr Ile His Ser Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15
 25
 <210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb13, huAb13Vh.1, huAb13Vh.1a, huAb13Vh.1b, huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8, y huAb13v9
 35
 <400> 35
 Tyr Asp Asp Tyr Phe Glu Tyr
 1 5
 40
 <210> 36
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb13
 <400> 36
 50
 55
 60
 65

ES 2 861 499 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

5 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Phe Asn
 20 25 30

10 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

15 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80

20 Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

25

<210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb13, huAb13VL.1, huAb13VL.1a,
 35 huAb13VL.1b, huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8, y
 huAb13v9

<400> 37

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Phe Asn Val Ala
 1 5 10

40

<210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de chAb13, huAb13VL.1, huAb13VL.1a,
 50 huAb13VL.1b, huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8, y
 huAb13v9

<400> 38

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 1 5

55

<210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de huAb13VL.1, huAb13VL.1a, huAb13VL.1b,
 65 huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8 y huAb13v9

<400> 39

ES 2 861 499 T3

| | |
|----|--|
| | Gln Gln Tyr Asn Trp Tyr Pro Phe Thr |
| | 1 5 |
| 5 | <210> 40 <211> 118 <212> PRT <213> Secuencia Artificial |
| 10 | <220> <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb12 <400> 40 |
| 15 | Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly 1 5 10 15 |
| 20 | Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr 20 25 30 |
| 25 | Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val 35 40 45 |
| 30 | Ala Thr Ile Ser Ser Gly Thr Asn Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val 50 55 60 |
| 35 | Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80 |
| 40 | Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys 85 90 95 |
| 45 | Ala Arg Gln Gly Arg Tyr Ser Trp Ile Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 100 105 110 |
| 50 | Leu Val Thr Val Ser Ala 115 |
| 55 | <210> 41 <211> 10 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220> <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb12 <400> 41 |
| 60 | Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser 1 5 10 |
| 65 | <210> 42 <211> 17 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220> <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb12 <400> 42 |

ES 2 861 499 T3

```

    Thr Ile Ser Ser Gly Thr Asn Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
    1           5           10           15

5      Gly

    <210> 43
    <211> 9
    <212> PRT
10     <213> Secuencia Artificial

    <220>
    <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb12
    <400> 43

15              Gln Gly Arg Tyr Ser Trp Ile Ala Tyr
                1           5

    <210> 44
    <211> 110
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
25     <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb12

    <400> 44

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

    Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
                20           25           30

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

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

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

    Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
                85           90           95

50     Glu Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
        100           105           110

    <210> 45
    <211> 15
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

    <220>
60     <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb12

    <400> 45

    Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Asp Tyr Ser Tyr Met His
    1           5           10           15

```

<210> 46
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de chAb12 y chAb17
 <400> 46
 10
 Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5
 <210> 47
 15
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb12
 <400> 47
 25
 Gln His Ser Arg Glu Leu Leu Thr
 1 5
 <210> 48
 30
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb14
 35
 <400> 48
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 40
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 45
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 50
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Phe Leu Tyr
 65 70 75 80
 55
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 60
 Ala Arg His Tyr Gly Ser Gln Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115
 65
 <210> 49

ES 2 861 499 T3

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb14 y chAb8

<400> 49

10

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Phe | Thr | Phe | Ser | Ser | Tyr | Gly | Met | Ser |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 |

<210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb14

20

<400> 50

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Ile | Ser | Gly | Gly | Gly | Thr | Asn | Thr | Tyr | Tyr | Pro | Asp | Ser | Val | Glu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

25

Gly

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb14

35

<400> 51

| | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| His | Tyr | Gly | Ser | Gln | Thr | Met | Asp | Tyr |
| 1 | | | | 5 | | | | |

40

<210> 52
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb14

50

<400> 52

55

60

65

ES 2 861 499 T3

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

5 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr
 20 25 30

10 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45

Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

15 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

20 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Ile Met Trp
 85 90 95

25 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb14

35 <400> 53

Arg Thr Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Thr
 1 5 10

40 <210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de chAb14

<400> 54

50 Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp
 1 5

<210> 55
 <211> 9
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb14

60 <400> 55

Gln His Phe Trp Ser Ile Met Trp Thr
 1 5

65 <210> 56

<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb6

<400> 56

```

10      Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
        1              5              10              15

        Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr
        20              25              30

        Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
        35              40              45

        Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
        50              55              60

        Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
        65              70              75              80

        Met Gln Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val His Tyr Cys
        85              90              95

        Ala Arg Arg Gly Tyr Gly Tyr Val Pro Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
        100              105              110

        Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
        115              120

```

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb6

<400> 57

```

50      Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr Trp Ile Glu
        1              5              10

```

<210> 58
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

55 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb6

60 <400> 58

```

        Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
        1              5              10              15

```

65 Gly

<210> 59
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb6
 <400> 59
 10
 Arg Gly Tyr Gly Tyr Val Pro Tyr Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10
 15
 <210> 60
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb6
 <400> 60
 25 Glu Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Ser
 20 25 30
 30 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Asn Leu Leu Ile
 35 40 45
 35 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 40 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 45 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 50
 <210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb6
 55
 <400> 61
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Ser Leu Asn
 1 5 10
 60
 <210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de chAb6

<400> 62

5 Tyr Thr Ser Arg Leu Tyr Ser
1 5

<210> 63

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb6

<400> 63

20 Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 64

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb11

<400> 64

30 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

40 Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
50 55 60

45 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

50 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
85 90 95

55 Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Pro Gly Asn Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 65

60 <211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb11

ES 2 861 499 T3

<400> 65

Gly Phe Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr Met Ser
1 5 10

5

<210> 66

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb11

<400> 66

15

Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Asp Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

20

<210> 67

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb11

<400> 67

30

Glu Ser Pro Gly Asn Pro Phe Ala Tyr
1 5

<210> 68

35

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb11

<400> 68

45

50

55

60

65

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

Lys

| | |
|----|--|
| 30 | <210> 69 |
| | <211> 17 |
| | <212> PRT |
| | <213> Secuencia Artificial |
| | <220> |
| 35 | <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb11 |
| | <400> 69 |

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Thr Gln Lys Asn Phe Leu
40 1 5 10 15

Thr

| | |
|----|---|
| 45 | <210> 70 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia Artificial |
| 50 | <220> <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de chAb11 <400> 70 |

55 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

60 <210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb11

<400> 71

ES 2 861 499 T3

Gln Asn Asp Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 72
5 <211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb16

<400> 72

Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Pro Gly Phe Gly Asn Tyr Ile Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 73
45 <211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
50 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb16

<400> 73

Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 74
55 <211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
60 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb16

<400> 74

65

ES 2 861 499 T3

Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
 1 5 10 15

5 Asp

<210> 75
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb16

15 <400> 75

Pro Gly Phe Gly Asn Tyr Ile Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

20

<210> 76
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb16

30 <400> 76

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

35

Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Phe
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

40

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Tyr Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

45

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

50

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

55

<210> 77
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb16

65 <400> 77

| | | | | | | | | | | | | |
|----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Arg | Ala | Ser | Gln | Asp | Ile | Ser | Asn | Phe | Leu | Asn | |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | |
| 5 | <210> 78 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia Artificial | | | | | | | | | | | |
| 10 | <220> <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de chAb16 <400> 78 | | | | | | | | | | | |
| 15 | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| 20 | <220> <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb16 <400> 79 | | | | | | | | | | | |
| 25 | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| 30 | <210> 80 <211> 125 <212> PRT <213> Secuencia Artificial | | | | | | | | | | | |
| 35 | <220> <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb10 <400> 80 | | | | | | | | | | | |
| 40 | Asp | Val | Gln | Leu | Gln | Glu | Ser | Gly | Pro | Gly | Leu | Val |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| 45 | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| 50 | Met | Gly | His | Ile | Asn | Tyr | Ser | Gly | Ile | Thr | Asn | Tyr |
| | 50 | | | | | | 55 | | | | 60 | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| 55 | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| 60 | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| 65 | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Ser | Val | Thr | Val | Ser |
| | 115 | | | | | | | 120 | | | | 125 |

<210> 81
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb10
 10 <400> 81

 Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5 10
 15 <210> 82
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb10

 <400> 82
 25 His Ile Asn Tyr Ser Gly Ile Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

 <210> 83
 <211> 16
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb10
 35 <400> 83
 Arg Ser Leu Phe Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10 15
 40 <210> 84
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb10

 <400> 84
 50

 55

 60

 65

ES 2 861 499 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Phe Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 5 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 10 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 15 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 20 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 25 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 85
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb10
 <400> 85
 35 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
 1 5 10 15
 40 <210> 86
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb10
 <400> 86
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
 50 1 5
 <210> 87
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb7
 <400> 87
 60
 65

ES 2 861 499 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Glu Asn Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Arg Gly Tyr
 20 25 30
 10 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 15 Ala Ala Ile Ser Thr Gly Gly Asn Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 20 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Asn Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 25 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 30 Ala Arg Arg Gly Gly Asn Tyr Ala Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115
 <210> 88
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb7
 40 <400> 88
 Gly Phe Ser Phe Arg Gly Tyr Gly Met Ser
 1 5 10
 45 <210> 89
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb7
 <400> 89
 Ala Ile Ser Thr Gly Gly Asn Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Gln
 1 5 10 15
 55 Gly
 60 <210> 90
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb7

<400> 90

Arg Gly Gly Asn Tyr Ala Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 91

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb7

<400> 91

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Pro Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 92

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb7

<400> 92

Arg Pro Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 93

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de chAb7 y chAb8

<400> 93

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

ES 2 861 499 T3

<210> 94
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb7
 <400> 94
 10
 Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 95
 15
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb8
 <400> 95
 25
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 35
 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Asn Tyr Thr Tyr Cys Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 40
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 45
 Thr Arg Gln Arg Gly Tyr Asp Tyr His Tyr Ala Met Asp Phe Trp Gly
 100 105 110
 50
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 96
 55
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb8
 <400> 96
 65

ES 2 861 499 T3

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Asn Tyr Thr Tyr Cys Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 5 Gly
 <210> 97
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb8
 15 <400> 97
 Gln Arg Gly Tyr Asp Tyr His Tyr Ala Met Asp Phe
 1 5 10
 <210> 98
 20 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb8
 <400> 98
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 35 Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 40 Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 45 Asn Gly Ser Asp Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Phe Cys Gln Asn Phe Trp Gly Thr Ser Trp
 85 90 95
 50 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 99
 55 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb8
 <400> 99
 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
 1 5 10

<210> 100
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb8
 <400> 100
 10
 Gln Asn Phe Trp Gly Thr Ser Trp Thr
 1 5
 <210> 101
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb17
 20
 <400> 101
 25
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 30
 Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 35
 Ala Ser Ile Val Ser Ser Asn Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 40
 Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 45
 Arg Ser Gly Thr Arg Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 50
 Val Thr Val Ser Ala
 115
 55
 <210> 102
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb17
 60
 <400> 102
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser
 1 5 10
 65
 <210> 103
 <211> 16

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb17

<400> 103

10 Ser Ile Val Ser Ser Asn Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met Lys Gly
 1 5 10 15

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15

<220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb17

20 <400> 104

 Ser Gly Thr Arg Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 105
<211> 111
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25

<220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb17

30 <400> 105

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

35

 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30

40

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

45

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

50

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

55

 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95

60

 Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 106
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

65

<220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb17

<400> 106

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Ala | Ser | Lys | Ser | Val | Ser | Thr | Ser | Ala | Tyr | Ser | Tyr | Met | His |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | 15 | |

<210> 107

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb17

<400> 107

| | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | His | Ser | Arg | Glu | Leu | Pro | Tyr | Thr |
| 1 | | | | 5 | | | | |

<210> 108

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb5

<400> 108

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Gln | Pro | Gly | Asp | Glu | Leu | Val | Lys | Pro | Gly | Ala |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Val | Lys | Leu | Ser | Cys | Lys | Thr | Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Thr | Asp |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Met | His | Trp | Val | Lys | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Met | Ile | His | Pro | Asn | Ser | Gly | Thr | Thr | Asn | Tyr | Asn | Glu | Lys | Phe |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Ser | Lys | Ala | Ala | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Ser | Ser | Thr | Ala | Cys |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gln | Leu | Ser | Ser | Leu | Thr | Ser | Glu | Asp | Ser | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Arg | Ser | Tyr | Trp | Lys | Trp | Tyr | Phe | Asp | Val | Trp | Gly | Thr | Gly | Thr |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |

| | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser |
| | | | | | 115 |

<210> 109

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb5

<400> 109

ES 2 861 499 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | | Gly | Tyr | Thr | Phe | Thr | Thr | Asp | Trp | Met | His | | | | | | | |
| | | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | | | |
| 5 | <210> | 110 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 17 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | Secuencia Artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 110 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | | Met | Ile | His | Pro | Asn | Ser | Gly | Thr | Thr | Asn | Tyr | Asn | Glu | Lys | Phe | Lys | |
| | | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| | | Ser | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | <210> | 111 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 9 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | Secuencia Artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 25 | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 111 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | | Ser | Tyr | Trp | Lys | Trp | Tyr | Phe | Asp | Val | | | | | | | | |
| | | 1 | | | | 5 | | | | | | | | | | | | |
| 35 | <210> | 112 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> | 106 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> | PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> | Secuencia Artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> | Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb5 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> | 112 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 45 | | Gln | Ile | Val | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Ala | Ile | Met | Ser | Ala | Ser | Leu | Gly | |
| | | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| | | Glu | Glu | Ile | Thr | Leu | Thr | Cys | Ser | Ala | Ser | Ser | Ser | Val | Ser | Tyr | Met | |
| | | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| 50 | | His | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Ser | Gly | Thr | Ser | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | |
| | | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| 55 | | Ser | Thr | Ser | Asn | Leu | Ala | Ser | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | |
| | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| | | Gly | Ser | Gly | Thr | Phe | Tyr | Ser | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Val | Glu | Ala | Glu | |
| | | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| 60 | | Asp | Ser | Ala | Asp | Tyr | Tyr | Cys | His | Gln | Trp | Thr | Ser | Tyr | Met | Tyr | Thr | |
| | | | | | 85 | | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| 65 | | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | | | | | | | |
| | | | | | 100 | | | | | | 105 | | | | | | | |

5 <210> 113
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb5
 10 <400> 113

 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10
 15 <210> 114
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de chAb5
 <400> 114
 25 Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 30 <210> 115
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb5
 <400> 115
 40 His Gln Trp Thr Ser Tyr Met Tyr Thr
 1 5
 45 <210> 116
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb18VH.1, huAb18v1, y huAb18v5
 50 <400> 116

 55

 60

 65

ES 2 861 499 T3

| | | | | | |
|----|---|-----|-----|-----|----|
| | Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser | 1 | 5 | 10 | 15 |
| 5 | Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr | 20 | 25 | 30 | |
| 10 | Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met | 35 | 40 | 45 | |
| | Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Ser Arg Asn Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe | 50 | 55 | 60 | |
| 15 | Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr | 65 | 70 | 75 | 80 |
| 20 | Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | 85 | 90 | 95 | |
| | Ala Arg Tyr Ser Gly Ser Thr Pro Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly | 100 | 105 | 110 | |
| 25 | Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser | 115 | 120 | | |
| 30 | <210> 117 <211> 121 <212> PRT <213> Secuencia Artificial | | | | |
| 35 | <220> <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb18VH.1a, huAb18v3, huAb18v8, y huAb18v9 | | | | |
| | <400> 117 | | | | |
| 40 | Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser | 1 | 5 | 10 | 15 |
| | Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr | 20 | 25 | 30 | |
| 45 | Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile | 35 | 40 | 45 | |
| 50 | Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Ser Arg Asn Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe | 50 | 55 | 60 | |
| 55 | Lys Asp Arg Thr Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr | 65 | 70 | 75 | 80 |
| | Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | 85 | 90 | 95 | |
| 60 | Ala Arg Tyr Ser Gly Ser Thr Pro Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly | 100 | 105 | 110 | |
| 65 | Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser | 115 | 120 | | |

<210> 118
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb18VH.1b, huAb18v2, huAb18v4, huAb18v6, huAb18v7, y huAb18v10

10 <400> 118

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

15 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

20 Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Ser Arg Asn Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

25 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

30 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

35 Ala Arg Tyr Ser Gly Ser Thr Pro Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

40 <210> 119
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de huAb18VH.1b

50 <400> 119

Tyr Ile Asn Pro Asn Ser Arg Asn Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
 1 5 10 15

55 Gly

<210> 120
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb18VL.1, huAb18v1, y huAb18v2

65 <400> 120

ES 2 861 499 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Asp | Ile | Gln | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Phe | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly | |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| 5 | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Ser | Ser | Val | Ser | Tyr | Met | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| 10 | Asn | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Lys | Ala | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | Tyr | |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| 15 | Ala | Thr | Ser | Asn | Leu | Ala | Ser | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| 20 | Gly | Ser | Gly | Thr | Glu | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro | Glu | |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | | |
| 25 | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | Trp | Ser | Ser | Asn | Pro | Leu | Thr | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| 30 | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | | | | | | | |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | | | |
| | <210> 121 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> 106 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> Secuencia Artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb18VL.1a, huAb18v3, y huAb18v4 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | <400> 121 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Asp | Ile | Gln | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Phe | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly | |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| 40 | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Ser | Ser | Val | Ser | Tyr | Met | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| 45 | Asn | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Lys | Ser | Pro | Lys | Pro | Trp | Ile | Tyr | |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| 50 | Ala | Thr | Ser | Asn | Leu | Ala | Ser | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Val | Ser | |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| 55 | Val | Ser | Gly | Thr | Glu | His | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro | Glu | |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | | |
| 60 | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | Trp | Ser | Ser | Asn | Pro | Leu | Thr | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| 65 | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | | | | | | | |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | | | |
| | <210> 122 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> 106 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> Secuencia Artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 861 499 T3

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb18VL.1b, huAb18v8, y huAb18v10

<400> 122

```

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

      Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
10      20           25           30

      Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
      35           40           45

15      Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Val Ser
      50           55           60

20      Gly Ser Gly Thr Glu His Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
      65           70           75           80

      Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
25      85           90           95

      Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100           105

```

<210> 123

<211> 106

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb18VL.2, huAb18v5, y huAb18v6

<400> 123

```

40      Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
      1           5           10           15

45      Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
      20           25           30

      Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys
50      35           40           45

      Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
      50           55           60

55      Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
      65           70           75           80

60      Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
      85           90           95

      Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100           105

```

<210> 124

ES 2 861 499 T3

<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb18VL.2a, huAb18v7, y huAb18v9

<400> 124

```

10      Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
        1             5             10             15

        Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
        20             25             30

        Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
        35             40             45

20      Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Val Ser
        50             55             60

        Val Ser Gly Thr Asp His Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
        65             70             75             80

        Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
        85             90             95

30      Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
        100             105

```

<210> 125
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb3VH.1, huAb3v1, y huAb3v4

<400> 125

45

50

55

60

65

ES 2 861 499 T3

| | | | | | |
|----|---|-----|-----|-----|----|
| | Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser | 1 | 5 | 10 | 15 |
| 5 | Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr | 20 | 25 | 30 | |
| 10 | Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met | 35 | 40 | 45 | |
| 15 | Gly Leu Ile His Pro Asp Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe | 50 | 55 | 60 | |
| 20 | Lys Asn Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr | 65 | 70 | 75 | 80 |
| 25 | Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | 85 | 90 | 95 | |
| 30 | Ala Arg Gly Gly Arg Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr | 100 | 105 | 110 | |
| 35 | Val Thr Val Ser Ser | 115 | | | |
| | <210> 126 | | | | |
| | <211> 117 | | | | |
| | <212> PRT | | | | |
| | <213> Secuencia Artificial | | | | |
| | <220> | | | | |
| | <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb3VH.1a, huAb3v3, y huAb3v6 | | | | |
| | <400> 126 | | | | |
| 40 | Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser | 1 | 5 | 10 | 15 |
| 45 | Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr | 20 | 25 | 30 | |
| 50 | Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile | 35 | 40 | 45 | |
| 55 | Gly Leu Ile His Pro Asp Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe | 50 | 55 | 60 | |
| 60 | Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr | 65 | 70 | 75 | 80 |
| 65 | Val Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys | 85 | 90 | 95 | |
| | Ala Gly Gly Gly Arg Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr | 100 | 105 | 110 | |
| | Val Thr Val Ser Ser | 115 | | | |

<210> 127
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb3VH.1b, huAb3v2, y huAb3v5

<400> 127

10

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

20

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Leu Ile His Pro Asp Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe
 50 55 60

25

Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

30

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Gly Gly Gly Arg Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

35

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 128
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3VL.1, huAb3vl, y huAb3v2

45

<400> 128

50

55

60

65

ES 2 861 499 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Asp | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Leu | Ser | Leu | Pro | Val | Thr | Pro | Gly | |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| 5 | Glu | Pro | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Arg | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Val | His | Ser | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| | Asn | Gly | Asp | Thr | Tyr | Leu | Arg | Trp | Tyr | Leu | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser | |
| 10 | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| | Pro | Gln | Leu | Leu | Ile | Tyr | Lys | Val | Ser | Asn | Arg | Phe | Ser | Gly | Val | Pro | |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| 15 | Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys | Ile | |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| | Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ser | Gln | Ser | |
| 20 | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| | Thr | His | Val | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys | |
| 25 | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| | <210> 129 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> 112 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> Secuencia Artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3VL.1a y huAb3v3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> 129 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | Asp | Val | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Leu | Ser | Leu | Pro | Val | Thr | Pro | Gly | |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| | Glu | Pro | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Arg | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Val | His | Ser | |
| 40 | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| | Asn | Gly | Asp | Thr | Tyr | Leu | Arg | Trp | Tyr | Leu | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser | |
| 45 | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| | Pro | Gln | Leu | Leu | Ile | Tyr | Lys | Val | Ser | Asn | Arg | Phe | Ser | Gly | Val | Pro | |
| 50 | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| | Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys | Ile | |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| 55 | Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Val | Tyr | Phe | Cys | Ser | Gln | Ser | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| | Thr | His | Val | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys | |
| 60 | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| | <210> 130 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> 112 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 65 | <213> Secuencia Artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 861 499 T3

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3VL.1b, huAb3v4, huAb3v5, y huAb3v6

<400> 130

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

<210> 131

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb3v2.1, huAb3v2.2, y huAb3v2.3

<400> 131

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

<210> 132
 <211> 17
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de huAb3v2.1, huAb3v2.2, y huAb3v2.3
 10 <400> 132

 Leu Ile His Pro Trp Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe Lys
 1 5 10 15

 15 Asn

 <210> 133
 <211> 112
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3v2.1, huAb3v2.4, y huAb3v2.7
 25 <400> 133

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

 30 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

 35 Ser Gly Asp Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

 40 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

 50 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

 55 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

 <210> 134
 <211> 16
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de huAb3v2.1, huAb3v2.4, y huAb3v2.7
 60 <400> 134

 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Ser Gly Asp Thr Tyr Leu Arg
 1 5 10 15
 65 <210> 135

<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3v2.2, huAb3v2.5, y huAb3v2.8

<400> 135

```

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

      Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
15              20              25              30

      Asn Arg Asp Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
              35              40              45

20      Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
              50              55              60

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

      Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
30              85              90              95

      Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
              100              105              110

```

35 <210> 136
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de huAb3v2.2, huAb3v2.5, y huAb3v2.8

<400> 136

```

45      Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Arg Asp Thr Tyr Leu Arg
      1              5              10              15

```

<210> 137
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3v2.3, huAb3v2.6, y huAb3v2.9

<400> 137

60

65

ES 2 861 499 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Asp | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Leu | Ser | Leu | Pro | Val | Thr | Pro | Gly |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| 5 | Glu | Pro | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Arg | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Val | His | Ser |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| 10 | Asn | Gln | Asp | Thr | Tyr | Leu | Arg | Trp | Tyr | Leu | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| 15 | Pro | Gln | Leu | Leu | Ile | Tyr | Lys | Val | Ser | Asn | Arg | Phe | Ser | Gly | Val | Pro |
| | | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | |
| 20 | Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys | Ile |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | 80 | |
| 25 | Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ser | Gln | Ser |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| 30 | Thr | His | Val | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| | <210> 138 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> 16 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> Secuencia Artificial | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de huAb3v2.3, huAb3v2.6, y huAb3v2.9 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <400> 138 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | Arg | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Val | His | Ser | Asn | Gln | Asp | Thr | Tyr | Leu | Arg |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| | <210> 139 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> 117 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> Secuencia Artificial | | | | | | | | | | | | | | | |
| 45 | <220> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb3v2.4, huAb3v2.5, y huAb3v2.6 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 50 | <400> 139 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 861 499 T3

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 5 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 10 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 15 Gly Leu Ile His Pro Glu Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe
 50 55 60
 20 Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 25 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 30 Ala Gly Gly Gly Arg Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 35 Val Thr Val Ser Ser
 115
 40 <210> 140
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de huAb3v2.4, huAb3v2.5, y huAb3v2
 <400> 140
 50 Leu Ile His Pro Glu Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe Lys
 1 5 10 15
 55 Asn
 60 <210> 141
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb3v2.7, huAb3v2.8, y huAb3v2.9
 <400> 141

ES 2 861 499 T3

1 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 5 5 10 15
 5 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 10 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 15 Gly Leu Ile His Pro Ile Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe
 50 55 60
 20 Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 25 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 30 Ala Gly Gly Gly Arg Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 35 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 142
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de huAb3v2.7, huAb3v2.8, y huAb3v2.9
 <400> 142
 40 Leu Ile His Pro Ile Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe Lys
 1 5 10 15
 Asn
 45 <210> 143
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb13VL.1, huAb13v2, huAb13v5, y huAb13v7
 <400> 143
 55
 60
 65

ES 2 861 499 T3

[illegible]

ES 2 861 499 T3

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAB13VL.1b, huAb13v4, huAb13v6, y huAb13v9
<400> 145

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

30 <210> 146
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb13VH.1, huAb13v2, huAb13v3, y huAb13v4
<400> 146

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

<210> 147

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb13VH.1a, huAb13v1, huAb13v5, y huAb13v6

10 <400> 147

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

15 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

20 Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp
35 40 45

25 Met Gly Tyr Ile His Ser Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

30 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

35 Ala Gly Tyr Asp Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

40 <210> 148

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb13VH.1b, huAb13v7, huAb13v8, y huAb13v9

<400> 148

50 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

55 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
20 25 30

Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp
35 40 45

60

65

ES 2 861 499 T3

| | |
|----|---|
| | Met Gly Tyr Ile His Ser Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu |
| | 50 55 60 |
| 5 | Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser |
| | 65 70 75 80 |
| 10 | Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |
| | 85 90 95 |
| 15 | Ala Arg Tyr Asp Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val |
| | 100 105 110 |
| | Thr Val Ser Ser |
| | 115 |
| 20 | <210> 149 |
| | <211> 534 |
| | <212> PRT |
| | <213> Homo sapiens |
| 25 | <220> |
| | <221> misc_característica |
| | <222> (1)..(534) |
| | <223> Secuencia de aminoácidos de la B7-H3 (humana) |
| 30 | <400> 149 |
| | Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala |
| | 1 5 10 15 |
| 35 | Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln |
| | 20 25 30 |
| 40 | Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu |
| | 35 40 45 |
| 45 | Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn |
| | 50 55 60 |
| | Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala |
| | 65 70 75 80 |
| 50 | Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe |
| | 85 90 95 |
| 55 | Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val |
| | 100 105 110 |
| 60 | |
| 65 | |

ES 2 861 499 T3

| | | |
|----|---|--|
| | Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp | |
| | 115 120 125 | |
| 5 | Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys | |
| | 130 135 140 | |
| 10 | Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr | |
| | 145 150 155 160 | |
| | Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val | |
| | 165 170 175 | |
| 15 | Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr | |
| | 180 185 190 | |
| 20 | Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Ile Leu | |
| | 195 200 205 | |
| 25 | Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn | |
| | 210 215 220 | |
| | Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Ser Ser Val Thr Ile Thr Pro Gln | |
| | 225 230 235 240 | |
| 30 | Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val | |
| | 245 250 255 | |
| 35 | Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro | |
| | 260 265 270 | |
| 40 | Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr | |
| | 275 280 285 | |
| | Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly | |
| | 290 295 300 | |
| 45 | Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln | |
| | 305 310 315 320 | |
| 50 | Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly | |
| | 325 330 335 | |
| | Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val | |
| | 340 345 350 | |
| 55 | Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu | |
| | 355 360 365 | |

ES 2 861 499 T3

Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser
 370 375 380
 5 Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln
 385 390 395 400
 10 Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu
 405 410 415
 15 Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala
 420 425 430
 20 Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp
 435 440 445
 25 Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro
 450 455 460
 30 Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu
 465 470 475 480
 35 Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys
 485 490 495
 40 Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly
 500 505 510
 45 Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp
 515 520 525
 50 Asp Gly Gln Glu Ile Ala
 530
 <210> 150
 <211> 692
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(692)
 <223> B7-H3-ECD humana (fusión a fc)
 <400> 150
 55 Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
 1 5 10 15
 60 Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
 65

ES 2 861 499 T3

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

ES 2 861 499 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Glu | Pro | Gly | Phe | Ser | Leu | Ala | Gln | Leu | Asn | Leu | Ile | Trp | Gln | Leu | Thr | |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| 5 | Asp | Thr | Lys | Gln | Leu | Val | His | Ser | Phe | Thr | Glu | Gly | Arg | Asp | Gln | Gly | |
| | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| 10 | Ser | Ala | Tyr | Ala | Asn | Arg | Thr | Ala | Leu | Phe | Pro | Asp | Leu | Leu | Ala | Gln | |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| | Gly | Asn | Ala | Ser | Leu | Arg | Leu | Gln | Arg | Val | Arg | Val | Ala | Asp | Glu | Gly | |
| | | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| 15 | Ser | Phe | Thr | Cys | Phe | Val | Ser | Ile | Arg | Asp | Phe | Gly | Ser | Ala | Ala | Val | |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |
| 20 | Ser | Leu | Gln | Val | Ala | Ala | Pro | Tyr | Ser | Lys | Pro | Ser | Met | Thr | Leu | Glu | |
| | | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |
| | Pro | Asn | Lys | Asp | Leu | Arg | Pro | Gly | Asp | Thr | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Ser | |
| 25 | | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | |
| | Ser | Tyr | Arg | Gly | Tyr | Pro | Glu | Ala | Glu | Val | Phe | Trp | Gln | Asp | Gly | Gln | |
| | 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | |
| 30 | Gly | Val | Pro | Leu | Thr | Gly | Asn | Val | Thr | Thr | Ser | Gln | Met | Ala | Asn | Glu | |
| | | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | |
| | Gln | Gly | Leu | Phe | Asp | Val | His | Ser | Val | Leu | Arg | Val | Val | Leu | Gly | Ala | |
| 35 | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | |
| | Asn | Gly | Thr | Tyr | Ser | Cys | Leu | Val | Arg | Asn | Pro | Val | Leu | Gln | Gln | Asp | |
| | | | 435 | | | | 440 | | | | | | 445 | | | | |
| 40 | Ala | His | Gly | Ser | Val | Thr | Ile | Thr | Gly | Gln | Pro | Met | Thr | Phe | Ala | Ala | |
| | | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | |
| 45 | Ala | Asp | Lys | Thr | His | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Glu | |
| | 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 | |
| | Gly | Ala | Pro | Ser | Val | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | |
| 50 | | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | | |
| | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | |
| | | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | |
| 55 | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | |
| | | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | | |
| 60 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 861 499 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr |
| | 530 | | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | |
| 5 | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn |
| | 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 |
| 10 | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro |
| | | | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | |
| 15 | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln |
| | | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | |
| 20 | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val |
| | | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | |
| 25 | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val |
| | 610 | | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | |
| 30 | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro |
| | 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 |
| 35 | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr |
| | | | | | 645 | | | | | 650 | | | | | 655 | |
| 40 | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val |
| | | | | 660 | | | | | 665 | | | | | 670 | | |
| 45 | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu |
| | | | 675 | | | | | 680 | | | | | 685 | | | |
| 50 | Ser | Pro | Gly | Lys | | | | | | | | | | | | |
| | | | 690 | | | | | | | | | | | | | |

<210> 151

<211> 474

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc_característica

<222> (1)..(474)

<223> B7-H3-ECD murina (fusión a fc)

<400> 151

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 55 | Met | Leu | Arg | Gly | Trp | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Gly | Val | Cys | Val | Arg | Thr |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| 60 | Ala | Leu | Gly | Val | Leu | Cys | Leu | Cys | Leu | Thr | Gly | Ala | Val | Glu | Val | Gln |

ES 2 861 499 T3

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

ES 2 861 499 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | Glu | Val | Thr | Cys |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| 5 | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | Lys | Phe | Asn | Trp |
| | 290 | | | | | | 295 | | | | 300 | | | | | |
| 10 | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | Leu | Thr | Val | Leu |
| 15 | | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | |
| | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | Lys | Val | Ser | Asn |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | |
| 20 | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile | Ser | Lys | Ala | Lys | Gly |
| | | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | |
| | Gln | Pro | Arg | Glu | Pro | Gln | Val | Tyr | Thr | Leu | Pro | Pro | Ser | Arg | Glu | Glu |
| 25 | | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | |
| | Met | Thr | Lys | Asn | Gln | Val | Ser | Leu | Thr | Cys | Leu | Val | Lys | Gly | Phe | Tyr |
| 30 | 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 |
| | Pro | Ser | Asp | Ile | Ala | Val | Glu | Trp | Glu | Ser | Asn | Gly | Gln | Pro | Glu | Asn |
| | | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | |
| 35 | Asn | Tyr | Lys | Thr | Thr | Pro | Pro | Val | Leu | Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Phe |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | |
| | Leu | Tyr | Ser | Lys | Leu | Thr | Val | Asp | Lys | Ser | Arg | Trp | Gln | Gln | Gly | Asn |
| 40 | | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | |
| | Val | Phe | Ser | Cys | Ser | Val | Met | His | Glu | Ala | Leu | His | Asn | His | Tyr | Thr |
| 45 | | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | |
| | Gln | Lys | Ser | Leu | Ser | Leu | Ser | Pro | Gly | Lys | | | | | | |
| | 465 | | | | | 470 | | | | | | | | | | |
| 50 | <210> 152 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> 460 | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> Homo sapiens | | | | | | | | | | | | | | | |
| 55 | <220> | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <221> misc_característica | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <222> (1)..(460) | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> B7-H3-ECD humana (marcada con his) | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60 | <400> 152 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 861 499 T3

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

ES 2 861 499 T3

| | 245 | 250 | 255 |
|----|--|-----|-----|
| 5 | Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala 260 265 270 | | |
| 10 | Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His 275 280 285 | | |
| 15 | Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr 290 295 300 | | |
| 20 | Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu 305 310 315 320 | | |
| 25 | Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser 325 330 335 | | |
| 30 | Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro 340 345 350 | | |
| 35 | Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro 355 360 365 | | |
| 40 | Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu 370 375 380 | | |
| 45 | Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn 385 390 395 400 | | |
| 50 | Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His 405 410 415 | | |
| 55 | Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu 420 425 430 | | |
| 60 | Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile 435 440 445 | | |
| 65 | Thr Gly Gln Pro Met Thr His His His His His His 450 455 460 | | |

ES 2 861 499 T3

<210> 153
 <211> 241
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus

 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(241)
 10 <223> B7-H3-ECD murina (marcada con his)

 <400> 153

 15 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Leu Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

 Val Gln Cys Val Glu Val Gln Val Ser Glu Asp Pro Val Val Ala Leu
 20 20 25 30

 Val Asp Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly
 35 40 45

 25 Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys
 50 55 60

 Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr
 65 70 75 80

 30 Ser Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Val Gln Gly Asn Ala
 85 90 95

 35 Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Thr Asp Glu Gly Ser Tyr Thr
 100 105 110

 40 Cys Phe Val Ser Ile Gln Asp Phe Asp Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln
 115 120 125

 Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys
 130 135 140

 45 Asp Leu Arg Pro Gly Asn Met Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln
 145 150 155 160

 50 Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Lys Asp Gly Gln Gly Val Pro
 165 170 175

 Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Arg Gly Leu
 180 185 190

 Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr
 195 200 205

 60 Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly
 210 215 220

 65 Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Leu Thr Phe His His His His His
 225 230 235 240

His

5 <210> 154
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis

 10 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(473)
 <223> B7-H3-ECD de Cynomolgus (marcada con his)

 15 <400> 154

 20 Met Leu His Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
 1 5 10 15

 25 Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
 20 25 30

 30 Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
 35 40 45

 35 Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
 50 55 60

 40 Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr
 65 70 75 80

 45 Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
 85 90 95

 50 Leu Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
 100 105 110

 55 Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
 115 120 125

 60 Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
 130 135 140

 65 Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
 145 150 155 160

 70 Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
 165 170 175

ES 2 861 499 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Phe | Trp | Gln | Asp | Gly | Gln | Gly | Ala | Pro | Leu | Thr | Gly | Asn | Val | Thr | Thr | |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| 5 | Ser | Gln | Met | Ala | Asn | Glu | Gln | Gly | Leu | Phe | Asp | Val | His | Ser | Val | Leu | |
| | | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| 10 | Arg | Val | Val | Leu | Gly | Ala | Asn | Gly | Thr | Tyr | Ser | Cys | Leu | Val | Arg | Asn | |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| 15 | Pro | Val | Leu | Gln | Gln | Asp | Ala | His | Gly | Ser | Ile | Thr | Ile | Thr | Pro | Gln | |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| 20 | Arg | Ser | Pro | Thr | Gly | Ala | Val | Glu | Val | Gln | Val | Pro | Glu | Asp | Pro | Val | |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| 25 | Val | Ala | Leu | Val | Gly | Thr | Asp | Ala | Thr | Leu | Arg | Cys | Ser | Phe | Ser | Pro | |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | | 270 | | |
| 30 | Glu | Pro | Gly | Phe | Ser | Leu | Ala | Gln | Leu | Asn | Leu | Ile | Trp | Gln | Leu | Thr | |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| 35 | Asp | Thr | Lys | Gln | Leu | Val | His | Ser | Phe | Thr | Glu | Gly | Arg | Asp | Gln | Gly | |
| | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| 40 | Ser | Ala | Tyr | Ala | Asn | Arg | Thr | Ala | Leu | Phe | Leu | Asp | Leu | Leu | Ala | Gln | |
| | 305 | | | | 310 | | | | | | 315 | | | | | 320 | |
| 45 | Gly | Asn | Ala | Ser | Leu | Arg | Leu | Gln | Arg | Val | Arg | Val | Ala | Asp | Glu | Gly | |
| | | | | | 325 | | | | | 330 | | | | | 335 | | |
| 50 | Ser | Phe | Thr | Cys | Phe | Val | Ser | Ile | Arg | Asp | Phe | Gly | Ser | Ala | Ala | Val | |
| | | | | 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | |
| 55 | Ser | Leu | Gln | Val | Ala | Ala | Pro | Tyr | Ser | Lys | Pro | Ser | Met | Thr | Leu | Glu | |
| | | | 355 | | | | 360 | | | | | | 365 | | | | |
| 60 | Pro | Asn | Lys | Asp | Leu | Arg | Pro | Gly | Asp | Thr | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Ser | |
| | | 370 | | | | 375 | | | | | | 380 | | | | | |
| 65 | Ser | Tyr | Arg | Gly | Tyr | Pro | Glu | Ala | Glu | Val | Phe | Trp | Gln | Asp | Gly | Gln | |
| | 385 | | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | |
| 70 | Gly | Ala | Pro | Leu | Thr | Gly | Asn | Val | Thr | Thr | Ser | Gln | Met | Ala | Asn | Glu | |
| | | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | 415 | | |
| 75 | Gln | Gly | Leu | Phe | Asp | Val | His | Ser | Val | Leu | Arg | Val | Val | Leu | Gly | Ala | |
| | | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | |
| 80 | Asn | Gly | Thr | Tyr | Ser | Cys | Leu | Val | Arg | Asn | Pro | Val | Leu | Gln | Gln | Asp | |
| | | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | |
| 85 | Ala | His | Gly | Ser | Val | Thr | Ile | Thr | Gly | Gln | Pro | Met | Thr | Phe | Ala | Ala | |
| | | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | |
| 90 | Ala | His | His | His | His | His | His | His | His | His | His | His | His | His | His | His | |
| | 465 | | | | | | 470 | | | | | | | | | | |

ES 2 861 499 T3

<210> 155
 <211> 98
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de IGHV1-69*06
 10 <400> 155

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

 Ala Arg
 40
 <210> 156
 <211> 11
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de IGHJ6*01
 45 <400> 156

 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 50
 <210> 157
 <211> 96
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de IGKV1-9*01
 60 <400> 157

 65

ES 2 861 499 T3

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

<210> 158

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de IGKJ2*01

<400> 158

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 159

<211> 330

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: región constante de Ig gamma-1

<400> 159

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

ES 2 861 499 T3

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

ES 2 861 499 T3

| | | | | |
|----|---|-----|-----|-----|
| | Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe | 275 | 280 | 285 |
| 5 | Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn | 290 | 295 | 300 |
| 10 | Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr | 305 | 310 | 315 |
| | Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys | 325 | 330 | |
| 15 | <210> 160 | | | |
| | <211> 330 | | | |
| | <212> PRT | | | |
| 20 | <213> Secuencia Artificial | | | |
| | <220> | | | |
| | <223> Sintética: mutante de la región constante de Ig gamma-1 | | | |
| | <400> 160 | | | |
| 25 | Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys | 1 | 5 | 10 |
| | | | | 15 |
| 30 | Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr | 20 | 25 | 30 |
| | Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser | 35 | 40 | 45 |
| 35 | Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser | 50 | 55 | 60 |
| 40 | Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr | 65 | 70 | 75 |
| | | | | 80 |
| 45 | Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys | 85 | 90 | 95 |
| | Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys | 100 | 105 | 110 |
| 50 | Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro | 115 | 120 | 125 |
| 55 | Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys | 130 | 135 | 140 |

ES 2 861 499 T3

| | | |
|----|---|-----------------|
| | Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp | |
| | 145 | 150 155 160 |
| 5 | Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu | |
| | | 165 170 175 |
| 10 | Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu | |
| | | 180 185 190 |
| 15 | His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn | |
| | | 195 200 205 |
| 20 | Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly | |
| | | 210 215 220 |
| 25 | Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu | |
| | | 225 230 235 240 |
| 30 | Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr | |
| | | 245 250 255 |
| 35 | Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn | |
| | | 260 265 270 |
| 40 | Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe | |
| | | 275 280 285 |
| 45 | Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn | |
| | | 290 295 300 |
| 50 | Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr | |
| | | 305 310 315 320 |
| 55 | Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys | |
| | | 325 330 |
| 60 | <210> 161 <211> 107 <212> PRT <213> Secuencia Artificial | |
| 65 | <220> <223> Sintética: región constante de Ig Kappa <400> 161 | |
| | Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu | |
| | 1 | 5 10 15 |

ES 2 861 499 T3

| | | |
|----|---|--|
| | Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe | |
| | 20 25 30 | |
| 5 | Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln | |
| | 35 40 45 | |
| 10 | Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser | |
| | 50 55 60 | |
| 15 | Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu | |
| | 65 70 75 80 | |
| | Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser | |
| | 85 90 95 | |
| 20 | Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys | |
| | 100 105 | |
| 25 | <210> 162 | |
| | <211> 105 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 30 | <220> | |
| | <223> Sintética: región constante de Ig Lambda | |
| | <400> 162 | |
| 35 | Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu | |
| | 1 5 10 15 | |
| 40 | Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe | |
| | 20 25 30 | |
| | Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val | |
| | 35 40 45 | |
| 45 | Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys | |
| | 50 55 60 | |
| 50 | Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser | |
| | 65 70 75 80 | |
| | His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu | |
| | 85 90 95 | |
| 55 | Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser | |
| | 100 105 | |
| 60 | <210> 163 | |
| | <211> 96 | |
| | <212> PRT | |
| | <213> Secuencia Artificial | |
| 65 | <220> | |
| | <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de IGKV6-21*01 | |

<220>
 <221> misc_característica
 <222> (96)..(96)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 163

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

<210> 164
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de IGKV2-28*01

<400> 164

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

<210> 165
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de IGKJ4*01

5 <400> 165

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

10 <210> 166

<211> 98

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de IGHV-b*01(0-1)

<400> 166

20 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

25 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

30 Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

35 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

40 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

45 <210> 167

<211> 96

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de IGKv1-39*01

<400> 167

55

60

65

ES 2 861 499 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly | |
| | 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | | 15 | | |
| 5 | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Ser | Ile | Ser | Ser | Tyr | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| 10 | Leu | Asn | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Lys | Ala | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| 15 | Tyr | Ala | Ala | Ser | Ser | Leu | Gln | Ser | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly | |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| 20 | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro | |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| 25 | Glu | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln | Ser | Tyr | Ser | Thr | Pro | Pro | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| | <210> 168 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> 446 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> Secuencia Artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de huAb13v1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 30 | <400> 168 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | Glu | Val | Gln | Leu | Gln | Glu | Ser | Gly | Pro | Gly | Leu | Val | Lys | Pro | Ser | Glu | |
| | 1 | | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | | |
| 40 | Thr | Leu | Ser | Leu | Thr | Cys | Ala | Val | Thr | Gly | Tyr | Ser | Ile | Thr | Ser | Gly | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| 45 | Tyr | Ser | Trp | His | Trp | Ile | Arg | Gln | Phe | Pro | Gly | Asn | Gly | Leu | Glu | Trp | |
| | | | 35 | | | | 40 | | | | | | 45 | | | | |
| 50 | Met | Gly | Tyr | Ile | His | Ser | Ser | Gly | Ser | Thr | Asn | Tyr | Asn | Pro | Ser | Leu | |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| 55 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 60 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 65 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 861 499 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Lys | Ser | Arg | Ile | Ser | Ile | Ser | Arg | Asp | Thr | Ser | Lys | Asn | Gln | Phe | Phe | 65 | 70 | 75 | 80 |
| 5 | Leu | Lys | Leu | Ser | Ser | Val | Thr | Ala | Ala | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | 85 | 90 | 95 | |
| 10 | Ala | Gly | Tyr | Asp | Asp | Tyr | Phe | Glu | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | Val | 100 | 105 | 110 | |
| 15 | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | Ala | 115 | 120 | 125 | |
| 20 | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | Leu | 130 | 135 | 140 | |
| 25 | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | Gly | 145 | 150 | 155 | 160 |
| 30 | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | Ser | 165 | 170 | 175 | |
| 35 | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | Leu | 180 | 185 | 190 | |
| 40 | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | Thr | 195 | 200 | 205 | |
| 45 | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | Thr | 210 | 215 | 220 | |
| 50 | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | 225 | 230 | 235 | 240 |
| 55 | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | Pro | 245 | 250 | 255 | |
| 60 | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | Val | 260 | 265 | 270 | |
| 65 | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | Thr | 275 | 280 | 285 | |
| | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | Val | 290 | 295 | 300 | |
| | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | Cys | 305 | 310 | 315 | 320 |

ES 2 861 499 T3

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 5
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 10
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 15
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 20
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 25
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 30
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 35
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 40
 <210> 169
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45
 <220>
 <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de huAb13v1
 50
 <400> 169
 55
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 60
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Phe Asn
 20 25 30
 65
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 70
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 75
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

ES 2 861 499 T3

| | | | | | |
|----|---|-----|-----|-----|-----|
| | Glu Asp Phe Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Trp Tyr Pro Phe | 85 | 90 | 95 | |
| 5 | Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala | 100 | 105 | 110 | |
| 10 | Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly | 115 | 120 | 125 | |
| 15 | Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala | 130 | 135 | 140 | |
| 20 | Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln | 145 | 150 | 155 | 160 |
| 25 | Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser | 165 | 170 | 175 | |
| 30 | Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr | 180 | 185 | 190 | |
| 35 | Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser | 195 | 200 | 205 | |
| 40 | Phe Asn Arg Gly Glu Cys | 210 | | | |
| 45 | <210> 170 <211> 447 <212> PRT <213> Secuencia Artificial | | | | |
| 50 | <220> <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de huAb3v2.5 | | | | |
| 55 | <400> 170 | | | | |
| 60 | Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser | 1 | 5 | 10 | 15 |
| 65 | Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr | 20 | 25 | 30 | |
| | Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile | 35 | 40 | 45 | |
| | Gly Leu Ile His Pro Glu Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe | 50 | 55 | 60 | |
| | Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr | | | | |

ES 2 861 499 T3

| | 65 | | | | | 70 | | | | | | 75 | | | | | 80 |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| 5 | Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| 10 | Ala | Gly | Gly | Gly | Arg | Leu | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr | |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| 15 | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu | |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| 20 | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys | |
| | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| 25 | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser | |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | |
| 30 | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser | |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | |
| 35 | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser | |
| | | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| 40 | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn | |
| | | 195 | | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| 45 | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His | |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| 50 | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val | |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| 55 | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr | |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| 60 | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu | |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| 65 | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys | |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| 70 | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser | |
| | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| 75 | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys | |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |

ES 2 861 499 T3

| | | | | |
|----|---|-----|-----|-----|
| | Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile | 325 | 330 | 335 |
| 5 | Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro | 340 | 345 | 350 |
| 10 | Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu | 355 | 360 | 365 |
| 15 | Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn | 370 | 375 | 380 |
| 20 | Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser | 385 | 390 | 395 |
| 25 | Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg | 405 | 410 | 415 |
| 30 | Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu | 420 | 425 | 430 |
| 35 | His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys | 435 | 440 | 445 |
| 40 | <210> 171 <211> 219 <212> PRT <213> Secuencia Artificial | | | |
| 45 | <220> <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de huAb3v2.5 | | | |
| 50 | <400> 171 | | | |
| 55 | Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly | 1 | 5 | 10 |
| 60 | Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser | 20 | 25 | 30 |
| 65 | Asn Arg Asp Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser | 35 | 40 | 45 |
| 70 | Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro | 50 | 55 | 60 |
| 75 | Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile | 65 | 70 | 80 |
| 80 | Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser | | | |

ES 2 861 499 T3

| | 85 | 90 | 95 |
|----|---|----|----|
| 5 | Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100 105 110 | | |
| 10 | Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu 115 120 125 | | |
| 15 | Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe 130 135 140 | | |
| 20 | Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln 145 150 155 160 | | |
| 25 | Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser 165 170 175 | | |
| 30 | Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu 180 185 190 | | |
| 35 | Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser 195 200 205 | | |
| 40 | Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys 210 215 | | |
| 45 | <210> 172 <211> 447 <212> PRT <213> Secuencia Artificial | | |
| 50 | <220> <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de huAb3v2.6 | | |
| 55 | <400> 172 | | |
| 60 | Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser 1 5 10 15 | | |
| 65 | Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr 20 25 30 | | |
| 70 | Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile 35 40 45 | | |
| 75 | Gly Leu Ile His Pro Glu Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe 50 55 60 | | |
| 80 | Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr 65 70 75 80 | | |

ES 2 861 499 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Met | Glu | Leu | Ser | Ser | Leu | Arg | Ser | Glu | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys |
| | | | | 85 | | | | | | 90 | | | | 95 | | |
| 5 | Ala | Gly | Gly | Gly | Arg | Leu | Tyr | Phe | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Thr |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| 10 | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Thr | Lys | Gly | Pro | Ser | Val | Phe | Pro | Leu |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| 15 | Ala | Pro | Ser | Ser | Lys | Ser | Thr | Ser | Gly | Gly | Thr | Ala | Ala | Leu | Gly | Cys |
| | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| 20 | Leu | Val | Lys | Asp | Tyr | Phe | Pro | Glu | Pro | Val | Thr | Val | Ser | Trp | Asn | Ser |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | 160 | |
| 25 | Gly | Ala | Leu | Thr | Ser | Gly | Val | His | Thr | Phe | Pro | Ala | Val | Leu | Gln | Ser |
| | | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| 30 | Ser | Gly | Leu | Tyr | Ser | Leu | Ser | Ser | Val | Val | Thr | Val | Pro | Ser | Ser | Ser |
| | | | 180 | | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| 35 | Leu | Gly | Thr | Gln | Thr | Tyr | Ile | Cys | Asn | Val | Asn | His | Lys | Pro | Ser | Asn |
| | | 195 | | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| 40 | Thr | Lys | Val | Asp | Lys | Lys | Val | Glu | Pro | Lys | Ser | Cys | Asp | Lys | Thr | His |
| | | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| 45 | Thr | Cys | Pro | Pro | Cys | Pro | Ala | Pro | Glu | Ala | Ala | Gly | Gly | Pro | Ser | Val |
| | 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| 50 | Phe | Leu | Phe | Pro | Pro | Lys | Pro | Lys | Asp | Thr | Leu | Met | Ile | Ser | Arg | Thr |
| | | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | |
| 55 | Pro | Glu | Val | Thr | Cys | Val | Val | Val | Asp | Val | Ser | His | Glu | Asp | Pro | Glu |
| | | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| 60 | Val | Lys | Phe | Asn | Trp | Tyr | Val | Asp | Gly | Val | Glu | Val | His | Asn | Ala | Lys |
| | | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | |
| 65 | Thr | Lys | Pro | Arg | Glu | Glu | Gln | Tyr | Asn | Ser | Thr | Tyr | Arg | Val | Val | Ser |
| | | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | |
| 70 | Val | Leu | Thr | Val | Leu | His | Gln | Asp | Trp | Leu | Asn | Gly | Lys | Glu | Tyr | Lys |
| | 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 |
| 75 | Cys | Lys | Val | Ser | Asn | Lys | Ala | Leu | Pro | Ala | Pro | Ile | Glu | Lys | Thr | Ile |

ES 2 861 499 T3

| | | | | | | | |
|----|---|-----|--|-----|--|-----|-----|
| | | 325 | | 330 | | 335 | |
| 5 | Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro | 340 | | 345 | | 350 | |
| 10 | Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu | 355 | | 360 | | 365 | |
| 15 | Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn | 370 | | 375 | | 380 | |
| 20 | Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser | 385 | | 390 | | 395 | 400 |
| 25 | Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg | 405 | | 410 | | 415 | |
| 30 | Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu | 420 | | 425 | | 430 | |
| 35 | His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys | 435 | | 440 | | 445 | |
| 40 | <210> 173 <211> 219 <212> PRT <213> Secuencia Artificial | | | | | | |
| 45 | <220> <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de huAb3v2.6 | | | | | | |
| 50 | <400> 173 | | | | | | |
| 55 | Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly | 1 | | 5 | | 10 | 15 |
| 60 | Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser | 20 | | 25 | | 30 | |
| 65 | Asn Gln Asp Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser | 35 | | 40 | | 45 | |
| 70 | Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro | 50 | | 55 | | 60 | |
| 75 | Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile | 65 | | 70 | | 75 | 80 |
| 80 | Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser | 85 | | 90 | | 95 | |

ES 2 861 499 T3

| | | | | |
|----|---|-----|-----|-----|
| | Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys | 100 | 105 | 110 |
| 5 | Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu | 115 | 120 | 125 |
| 10 | Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe | 130 | 135 | 140 |
| 15 | Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln | 145 | 150 | 155 |
| | Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser | 165 | 170 | 175 |
| 20 | Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu | 180 | 185 | 190 |
| 25 | Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser | 195 | 200 | 205 |
| 30 | Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys | 210 | 215 | |
| 35 | <210> 174 <211> 117 <212> PRT <213> Secuencia Artificial | | | |
| 40 | <220> <221> misc_característica <222> (99)..(106) <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural; esta sección representa la región CDR-H3 | | | |
| 45 | <400> 174 | | | |
| 50 | Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser | 1 | 5 | 10 |
| 55 | Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr | 20 | 25 | 30 |
| 60 | Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met | 35 | 40 | 45 |
| 65 | | | | |

ES 2 861 499 T3

| | |
|----|--|
| | Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe |
| | 50 55 60 |
| 5 | Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr |
| | 65 70 75 80 |
| 10 | Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys |
| | 85 90 95 |
| 15 | Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Thr |
| | 100 105 110 |
| | Val Thr Val Ser Ser |
| | 115 |
| 20 | <210> 175 |
| | <211> 112 |
| | <212> PRT |
| | <213> Secuencia Artificial |
| 25 | <220> |
| | <223> Sintética: IGKV2-28*01_IGKJ4 |
| | <220> |
| | <221> misc_característica |
| 30 | <222> (94)..(102) |
| | <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural; esta sección representa la región CDR-L3 |
| | <400> 175 |
| 35 | Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly |
| | 1 5 10 15 |
| 40 | Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser |
| | 20 25 30 |
| | Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser |
| | 35 40 45 |
| 45 | Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro |
| | 50 55 60 |
| 50 | Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile |
| | 65 70 75 80 |
| | Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa |
| | 85 90 95 |
| 55 | Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys |
| | 100 105 110 |
| 60 | <210> 176 |
| | <211> 116 |
| | <212> PRT |
| | <213> Secuencia Artificial |
| 65 | <220> |
| | <223> Sintética: IGHV4-b_IGHJ6 |

ES 2 861 499 T3

<220>

<221> misc_característica

<222> (99)..(105)

5 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural; esta sección representa la región CDR-H3

<400> 176

```

10      Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
        1              5              10              15

        Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly
              20              25              30

15      Tyr Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
              35              40              45

20      Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
              50              55              60

25      Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
        65              70              75              80

        Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
              85              90              95

30      Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
              100              105              110

35      Thr Val Ser Ser
              115

```

<210> 177

<211> 107

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética: IGKV1-39_IGKJ2

45

<220>

<221> misc_característica

<222> (89)..(97)

50 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural; esta sección representa la región CDR-L3

<400> 177

55

60

65

ES 2 861 499 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | Asp | Ile | Gln | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Ser | Ser | Leu | Ser | Ala | Ser | Val | Gly | |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| 5 | Asp | Arg | Val | Thr | Ile | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Gln | Ser | Ile | Ser | Ser | Tyr | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| 10 | Leu | Asn | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Lys | Ala | Pro | Lys | Leu | Leu | Ile | |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| 15 | Tyr | Ala | Ala | Ser | Ser | Leu | Gln | Ser | Gly | Val | Pro | Ser | Arg | Phe | Ser | Gly | |
| | | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| 20 | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr | Ile | Ser | Ser | Leu | Gln | Pro | |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| 25 | Glu | Asp | Phe | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | Xaa | |
| | | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| 30 | Xaa | Phe | Gly | Gln | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu | Ile | Lys | | | | | | |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | | | | |
| | <210> 178 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <211> 112 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <212> PRT | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <213> Secuencia Artificial | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de las variantes VL1 de huAb3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | <220> | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <221> misc_característica | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <222> (33)..(33) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural, excepto M, C, N, D o Q | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 40 | <400> 178 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Asp | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Leu | Ser | Leu | Pro | Val | Thr | Pro | Gly | |
| | 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| 45 | Glu | Pro | Ala | Ser | Ile | Ser | Cys | Arg | Ser | Ser | Gln | Ser | Leu | Val | His | Ser | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | |
| 50 | Xaa | Gly | Asp | Thr | Tyr | Leu | Arg | Trp | Tyr | Leu | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ser | |
| | | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | | |
| 55 | Pro | Gln | Leu | Leu | Ile | Tyr | Lys | Val | Ser | Asn | Arg | Phe | Ser | Gly | Val | Pro | |
| | | | 50 | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | |
| 60 | Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Lys | Ile | |
| | 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | |
| 65 | Ser | Arg | Val | Glu | Ala | Glu | Asp | Val | Gly | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ser | Gln | Ser | |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | | 95 | | |
| | Thr | His | Val | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Val | Glu | Ile | Lys | |
| | | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |

<210> 179
 <211> 112
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de las variantes VL1 de huAb3
 10 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (34)..(34)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural, excepto M, C, G, S, N o P
 15 <400> 179

 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 20 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 25 Asn Xaa Asp Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 30 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 35 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 40 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 180
 <211> 117
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de las variantes VH1b de huAb3
 50 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (54)..(54)
 <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural, excepto M, C, N, D o Q
 55 <400> 180

 60

 65

ES 2 861 499 T3

| | | | | | |
|----|--|-----|-----|-----|----|
| | Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser | 1 | 5 | 10 | 15 |
| 5 | Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr | 20 | 25 | 30 | |
| 10 | Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile | 35 | 40 | 45 | |
| 15 | Gly Leu Ile His Pro Xaa Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe | 50 | 55 | 60 | |
| 20 | Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Thr Ser Thr Ala Tyr | 65 | 70 | 75 | 80 |
| 25 | Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | 85 | 90 | 95 | |
| 30 | Ala Gly Gly Gly Arg Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr | 100 | 105 | 110 | |
| 35 | Val Thr Val Ser Ser | 115 | | | |
| 40 | <210> 181 <211> 117 <212> PRT <213> Secuencia Artificial | | | | |
| 45 | <220> <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de las variantes VH1b de huAb3 | | | | |
| 50 | <220> <221> misc_característica <222> (55)..(55) <223> X puede ser cualquier aminoácido de origen natural, excepto M, C, G, S, N, o P | | | | |
| 55 | <400> 181 | | | | |

ES 2 861 499 T3

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

30

<210> 182
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb13

40

<400> 182

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe Thr
 1 5

45

50

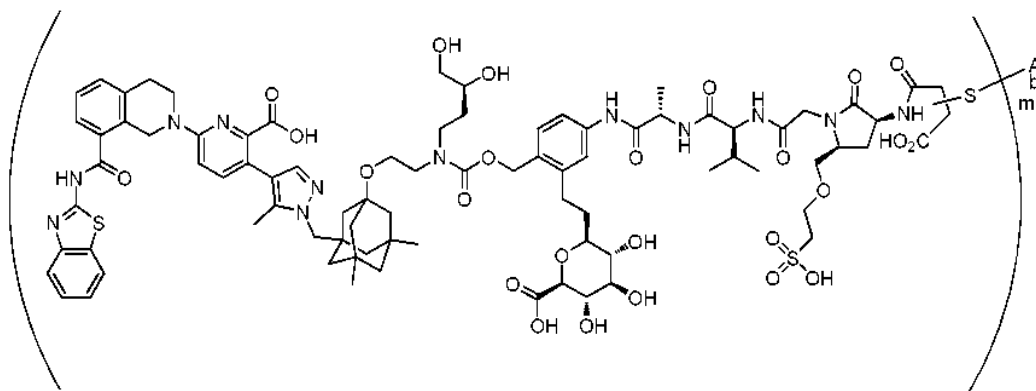
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado anticuerpo anti-B7H3 humano (hB7-H3)-fármaco (ADC) que comprende la siguiente estructura:



en donde m es 2 y Ab es un anticuerpo anti-hB7-H3, en donde el anticuerpo Ab comprende

un dominio CDR3 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 35, un dominio CDR2 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 34 y un dominio CDR1 de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 33; y
un dominio CDR3 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 39, un dominio CDR2 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 38 y un dominio CDR1 de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO: 37.

2. Un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 147 y una región variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 144.
3. Un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 168 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 169.

Figura 1

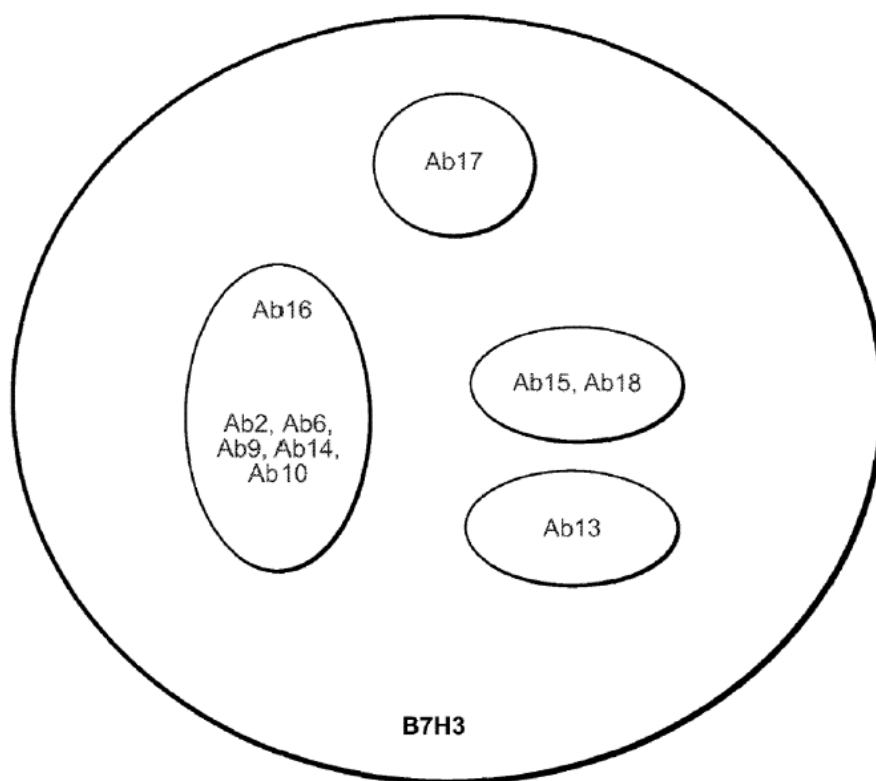
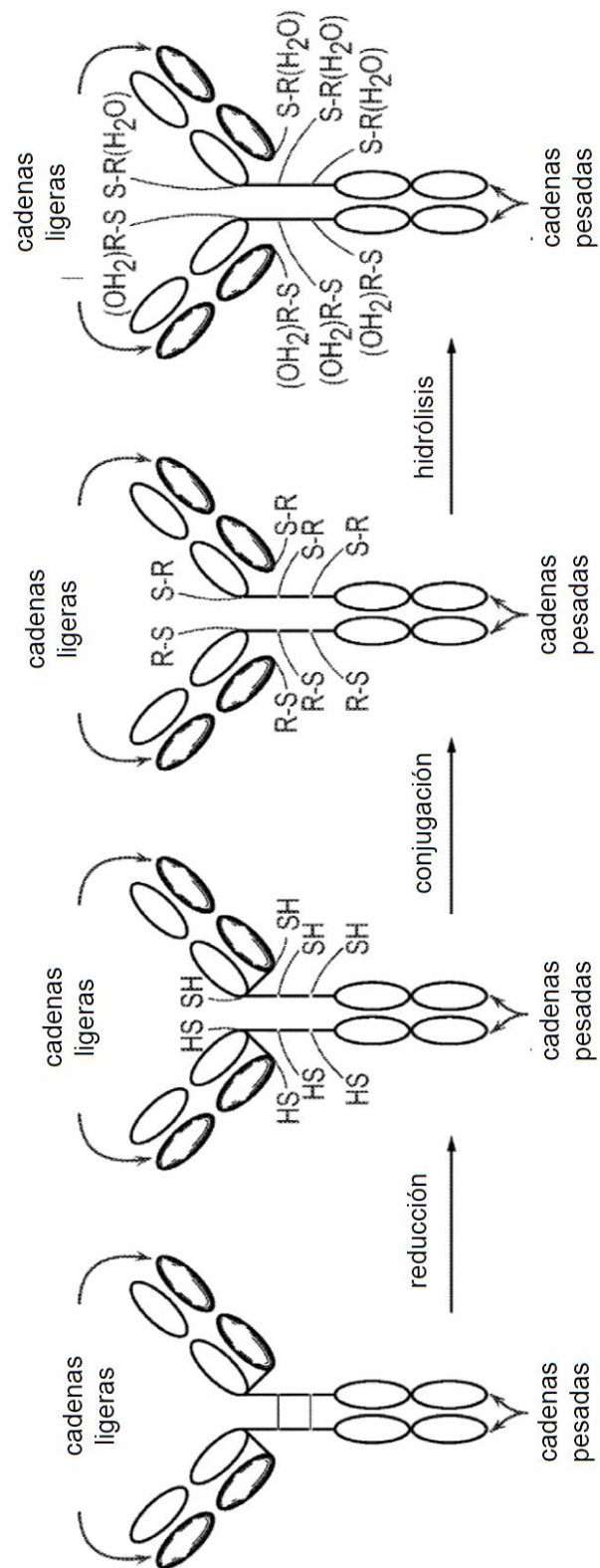


Figura 2



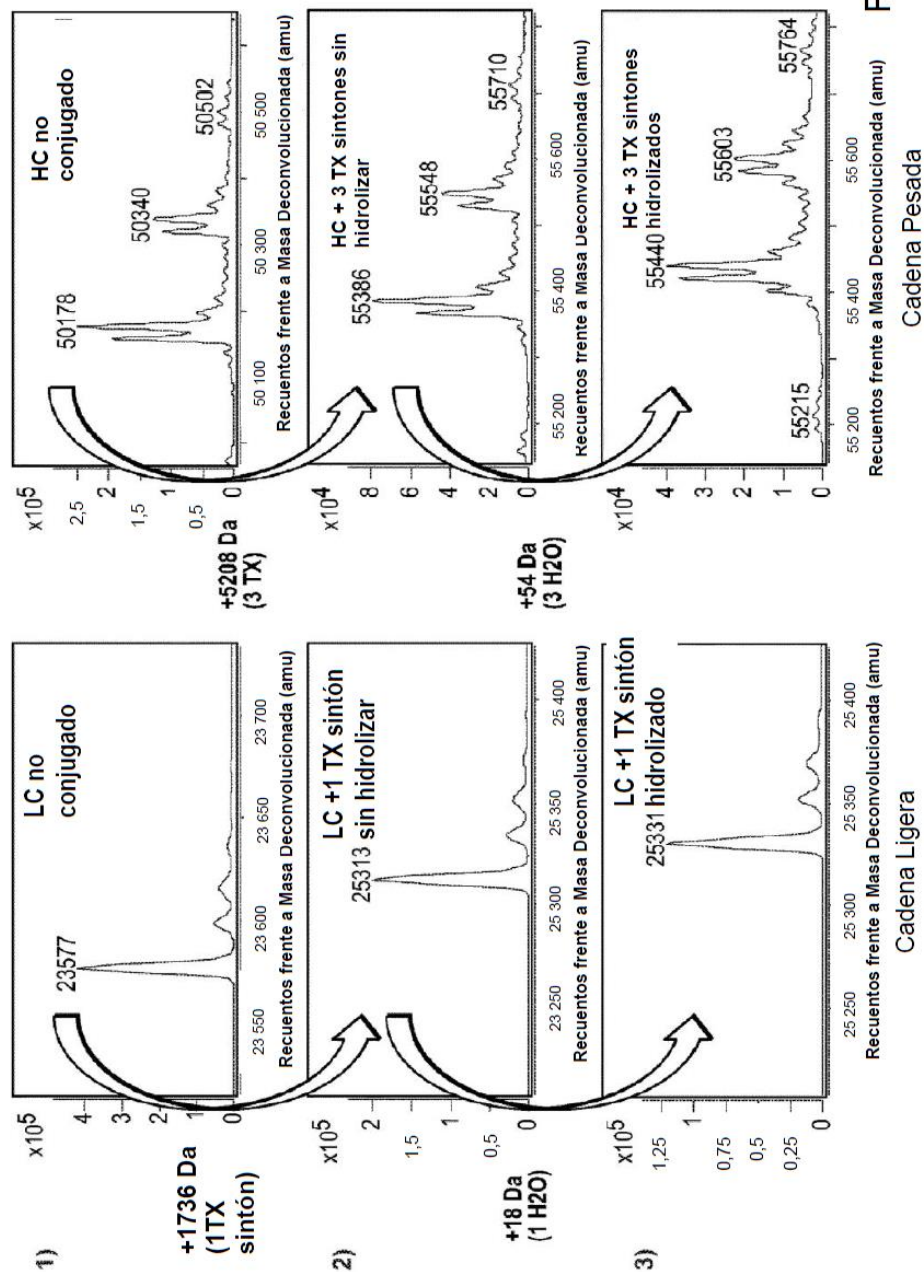


Figura 5