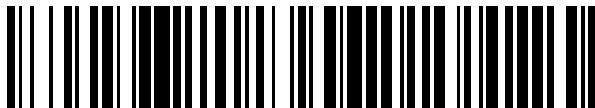




OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



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

⑮ Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2017 PCT/US2017/036445**

⑰ Fecha y número de publicación internacional: **14.12.2017 WO17214335**

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2017 E 17732657 (6)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2020 EP 3458479**

④ Título: **Anticuerpos anti-B7-H3 y conjugados anticuerpo-fármaco**

⑩ Prioridad:

08.06.2016 US 201662347476 P
25.07.2016 US 201662366511 P

④ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.10.2021

⑬ Titular/es:

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

⑭ Inventor/es:

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

⑭ 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)).

10 15 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 mieloídes (TREM-) como el transcríto 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. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 105(30): 10495-500 (2008)).

20 25 30 B7-H3 no se expresa constitutivamente en muchas células inmunes (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), células T y células presentadoras de抗ígenos (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 linfocítico, 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.

35 40 45 50 55 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)).

60 65 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)).

65 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.

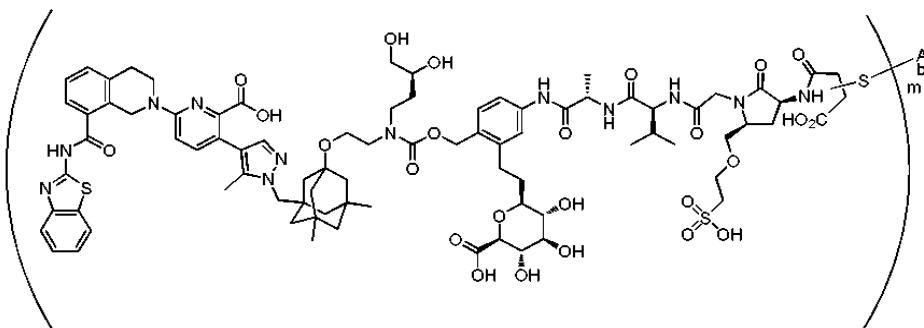
10 El documento US 2012/0294796 se refiere a los anticuerpos anti-B7-H3 y las composiciones farmacéuticas que los comprenden. El documento US 2012/0294796 señala que los anticuerpos anti-B7-H3 descritos en él pueden conjugarse o asociarse con una molécula radiactiva, toxina (calicheamicina), molécula 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:



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

45 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

50 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.

55 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 el amino secuencia de ácido 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.

60 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.

65 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.
- 10 En una modalidad, el cáncer es cáncer de mama triple negativo.
- En una modalidad, el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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),
- 35 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).
- 40 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.
- 45 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:
- 50 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;
- 55 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.
- 60 Breve descripción de los dibujos
- La Figura 1 es una representación gráfica de la agrupación de epítopos de anticuerpos del hibridoma anti-B7-H3 murino según se determina mediante ensayos de unión por pares.
- 65 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.

5 Descripción detallada de la invención
 10 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.

15 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.

20 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.

25 30 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:

35 I. Definiciones
 II. Anticuerpos Anti-B7-H3
 40 II.A. Anticuerpos Anti-B7-H3 Químéricos
 II.B. Anticuerpos Anti-B7-H3 Humanizados

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

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

45 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
 50 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

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

60 IV. Purificación de ADC anti-B7-H3
 V. Usos de Anticuerpos Anti-B7-H3 y ADC anti-B7-H3
 VI. Composiciones Farmacéuticas

Definiciones

65 65 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 5 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 10 proporciona más abajo como SEQ ID NO: 149, donde el péptido señal (residuos de aminoácidos 1-28) está subrayado.

MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQ
 15 LTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSI RDFGSAAVSL
 QVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDV
 HSILRVVILGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSP
 EPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTC
 FVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNV
 20 TTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVC
 LIALLVALAFVCWRKIKQSCEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA (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 25 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 30 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 epítopo) 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 epítopo "A", la presencia de una molécula que contiene el epítopo A (o A libre, sin marcar), en una reacción que contiene "A" marcado y el 35 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 40 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 45 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 50 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 55 (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, IgG 3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase.

Si bien el término "anticuerpo" no pretende incluir porciones de unión a antígeno de un anticuerpo (definido más 60 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 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 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 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 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 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 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.

35

40

45

50

55

60

65

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
5	Región constante de Ig gamma-1	SEQ ID NO:159	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDK KVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHT QKSLSLSPGK
10	Mutante de la región constante de Ig gamma-1	SEQ ID NO:160	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDK KVEPKSCDKTHCPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHT QKSLSLSPGK
15	Región constante de Ig Kappa	SEQ ID NO:161	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSLTLSKADYEHKVKYACEVTHQGLSS PVTKSFRNRC
20	Región constante de Ig Lambda	SEQ ID NO:162	QPKAAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNK YAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
25			
30			
35			

40 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 antigenicas (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.

45 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.

- 5 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.
- 10 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.
- 15
- 20 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
- 25 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"
- 30
- 35 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
- 40 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.
- 45 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.
- 50
- 55 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.

5 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.

10 10 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.

15 20 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.

25 25 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.

30 30 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.

35 40 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 atípico. 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.

45 50 55 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 atípico. 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 "epítopo" 5 se refiere a una región de un antígeno que está unido por un anticuerpo o ADC. En determinadas modalidades, los determinantes de los epítopos incluyen agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en determinadas modalidades, pueden tener 10 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 15 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.

20 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.

25 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 30 calcula mediante k_a/k_d .

35 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.

40 El término "ensayo de unión competitiva" es un ensayo usado para determinar si dos o más anticuerpos se unen al mismo epítopo. 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 epítopo 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 epitopo reducirá el nivel de fluorescencia.

45 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 biotinilo 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 biotinilo; epítopos 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 epítopo); y agentes magnéticos, tales como quelatos de gadolinio.

55 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.

60 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).

5 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.

10 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.

15 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.

20 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 sobreexprese 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).

55 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.

60 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.

- 5 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.
- 10 10 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.
- 15 15 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, transtracheal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.
- 20 20 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.
- 25 25 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.
- 30 30 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.
- 35 35 Como se usa en la presente descripción, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

- 40 40 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.
- 45 45 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.
- 50 50 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

- 60 60 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.

- 65 65 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 Químéricos

Un anticuerpo químérico 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 químéricos 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 químéricos" (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 antigenética 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 químéricos, 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 químéricos 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 químéricos 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.

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); Verhoeven 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, 15 Patentes de los EE.UU Núm. 5,565,332, 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 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

20 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);
 25 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);
 30 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);
 35 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);
 40 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);
 45 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);
 50 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);
 55 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).

60 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 epítopo que Ab13.

65 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 5 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 10 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, 15 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 20 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 25 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 30 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 35 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 40 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 FCyRs 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 45 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 50 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 55 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 60 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 65 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 (¹¹¹In). El ¹¹¹Indio 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 ¹¹¹I mediante un quelante bifuncional que es un quelato de ácido ciclohexil dietilentriaminopentaacético (DTPA) bifuncional (véanse las Patentes de EE. UU. Núm. 5,124,471; 15 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; 30 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. 40 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. 45 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 50 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 55 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 60 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 5 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, 10 secreción, reconocimiento por otras proteínas o factores, antigenicidad o alergenicidad. 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 15 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 15 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 20 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 25 Solicitud PCT WO2005100584 A2).

Los anticuerpos pueden producirse mediante varias técnicas. Por ejemplo, la expresión a partir de células huésped, 25 en donde el vector o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfecstan 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 30 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 35 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 40 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 45 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 50 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 55 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 60 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 65 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.

- 5 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 28611211; Liu y otros, (2011) J. Biol. Chem. 286:11211.

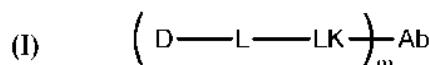
II. Conjugados Anticuerpo-Fármaco anti-B7-H3 (ADC)

- 15 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.

20 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.

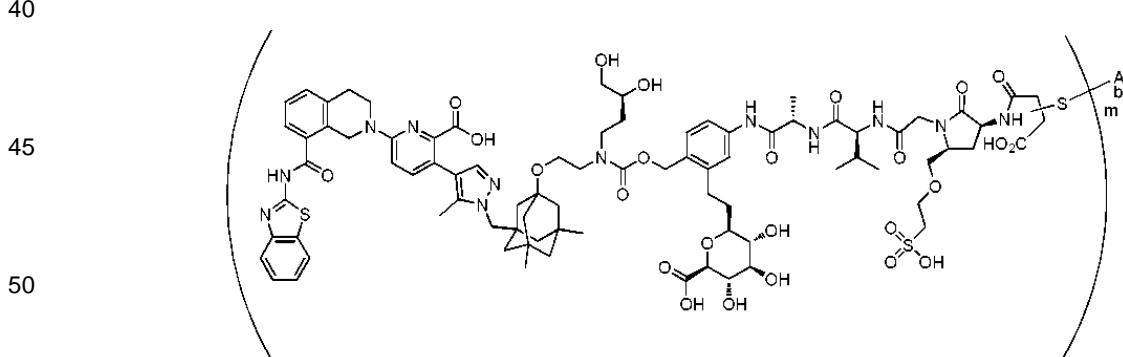
25 Los términos "fármaco", "agente" y "resto de fármaco" se usan indistintamente en la presente descripción. Los términos "unido" y "conjugado" también se usan indistintamente en la presente descripción e indican que el anticuerpo y el resto están unidos covalentemente.

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



35 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.

40 En la presente invención, el ADC es:



- 45 55 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

- 60 65 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 esquiva. 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 permeable 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).

5 Típicamente, los inhibidores de Bcl-XL rendirán una EC₅₀ 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 EC₅₀, 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 10 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 15 (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 EC₅₀ de menos de 20 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 EC₅₀, 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 25 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 35 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

40 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 45 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.

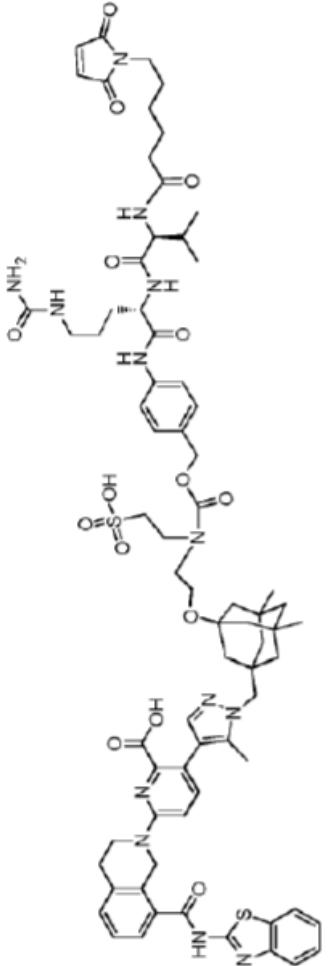
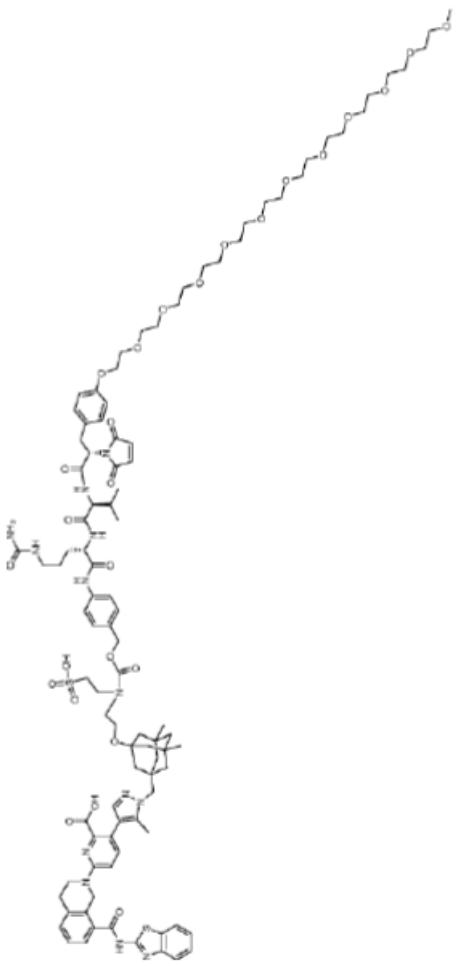
III.A.3. Sintones Bcl-xL ADC

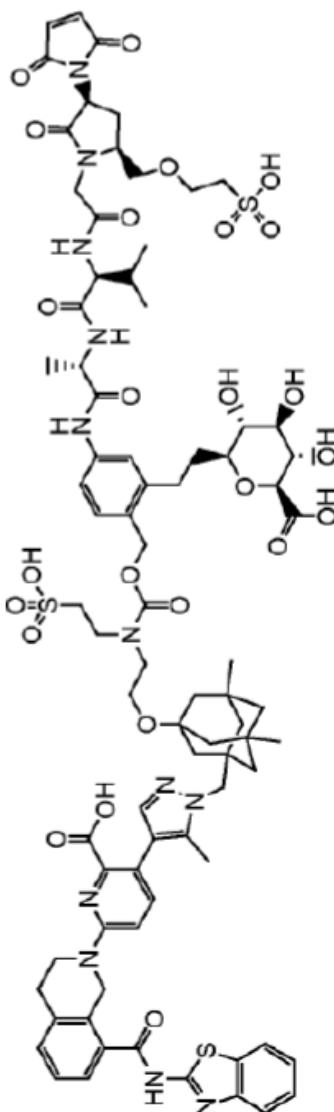
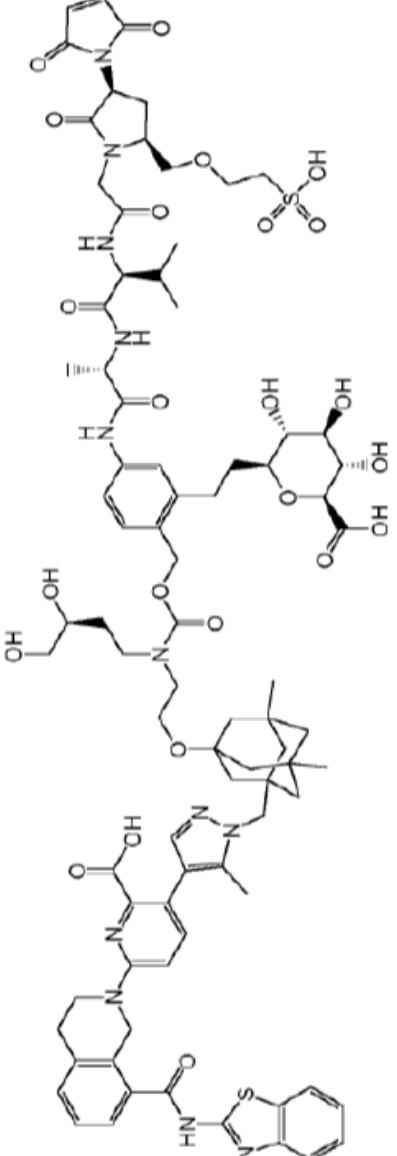
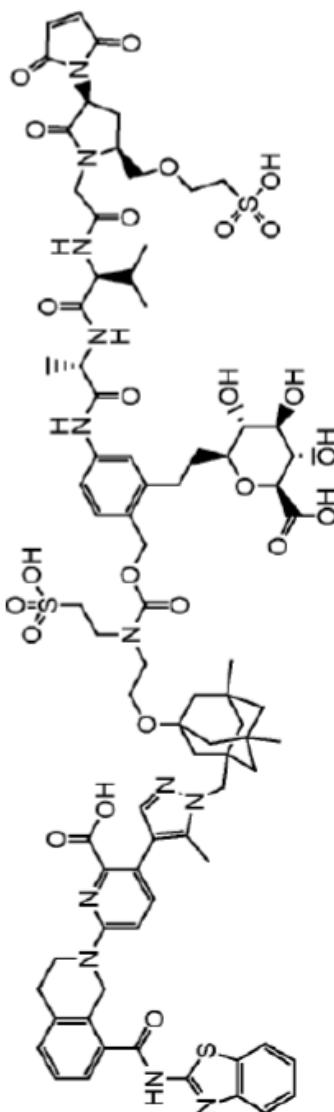
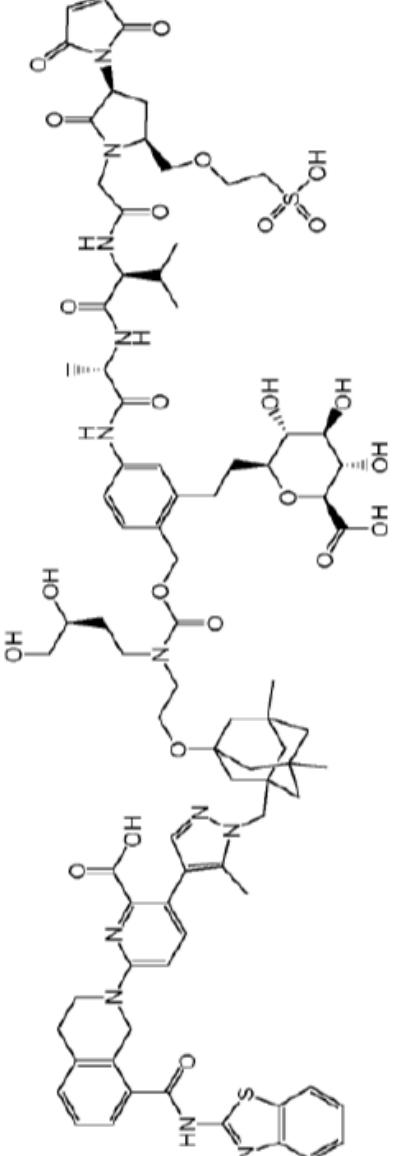
55 Los sintones conjugados de anticuerpo-fármaco son intermediarios sintéticos que se utilizan para formar los ADC. Los sintones son generalmente compuestos de acuerdo con la fórmula estructural (III):

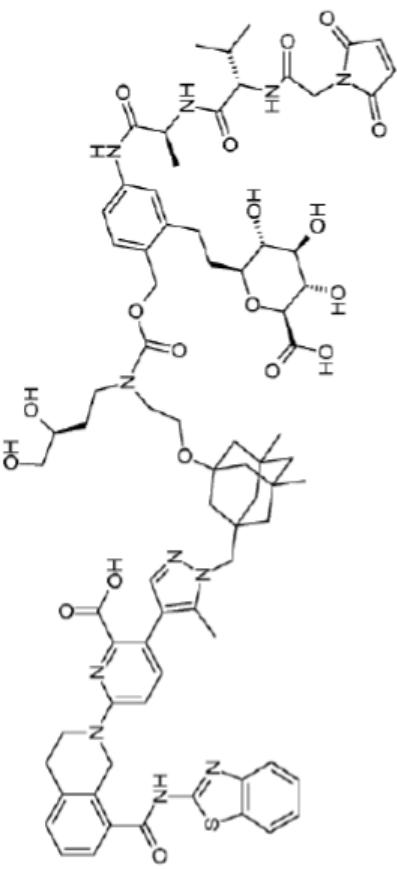
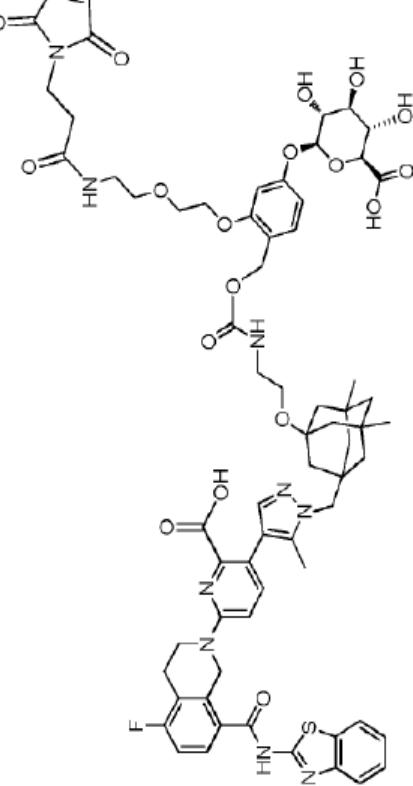


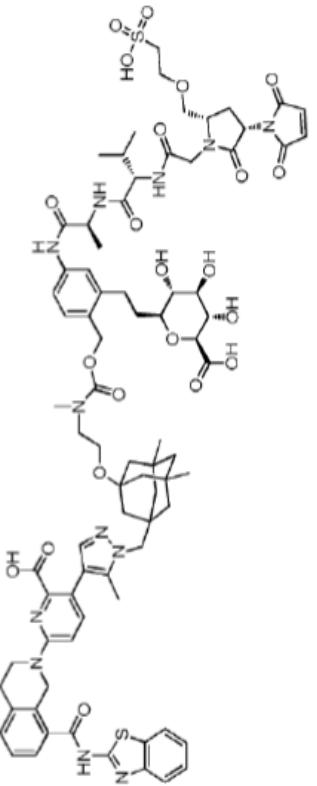
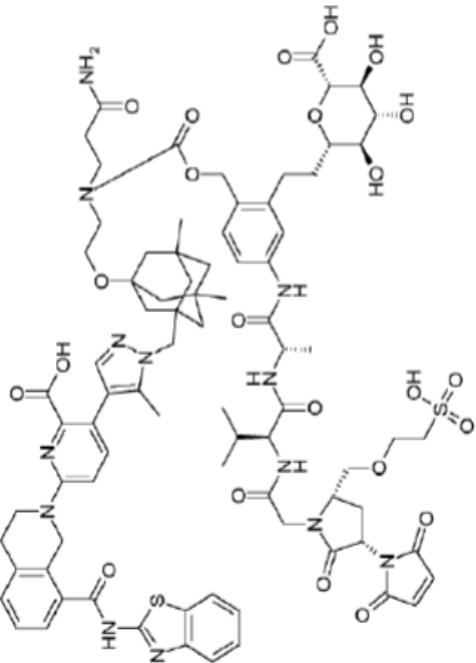
60 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde D es un inhibidor de Bcl-xL como se describió anteriormente, L es un enlazador como se describió anteriormente y R^x es un grupo reactivo adecuado para unir el síntón a un anticuerpo.

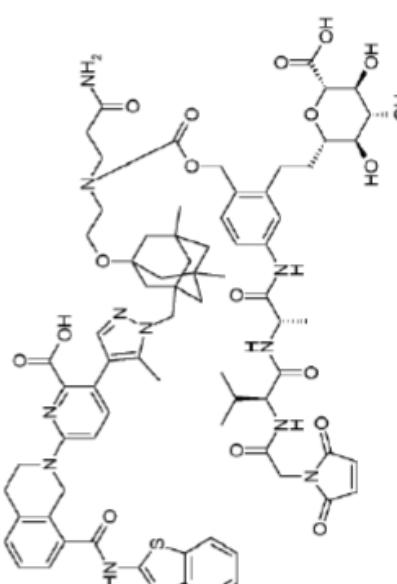
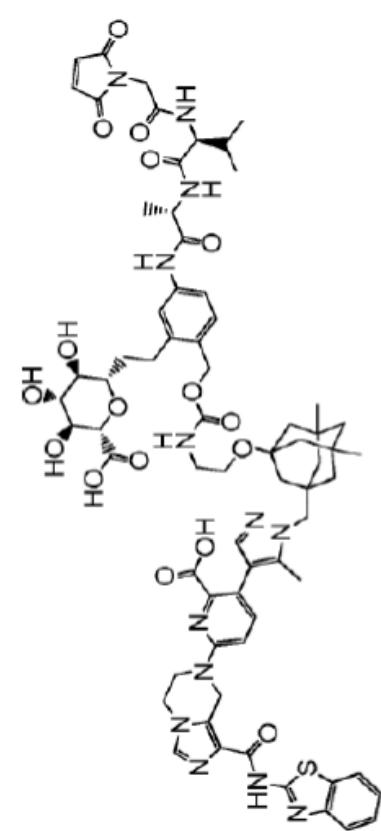
65 Los sintones usados en los Ejemplos de la presente solicitud se enumeran a continuación en la Tabla B. El síntón de la presente invención es el Ejemplo Núm. 2.166 (AAA).

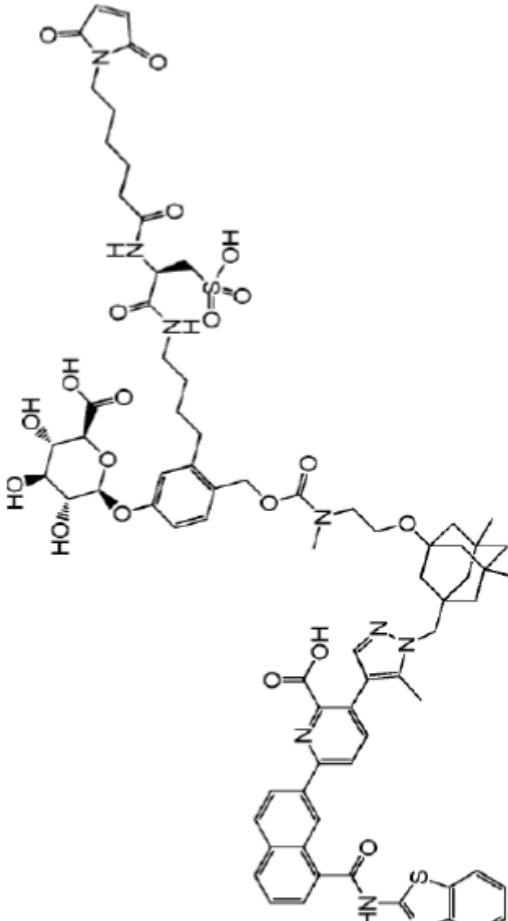
Ejemplo Núm.	Código del Síntón	Estructura del Síntón
2.1	CZ	
2.122	TV	

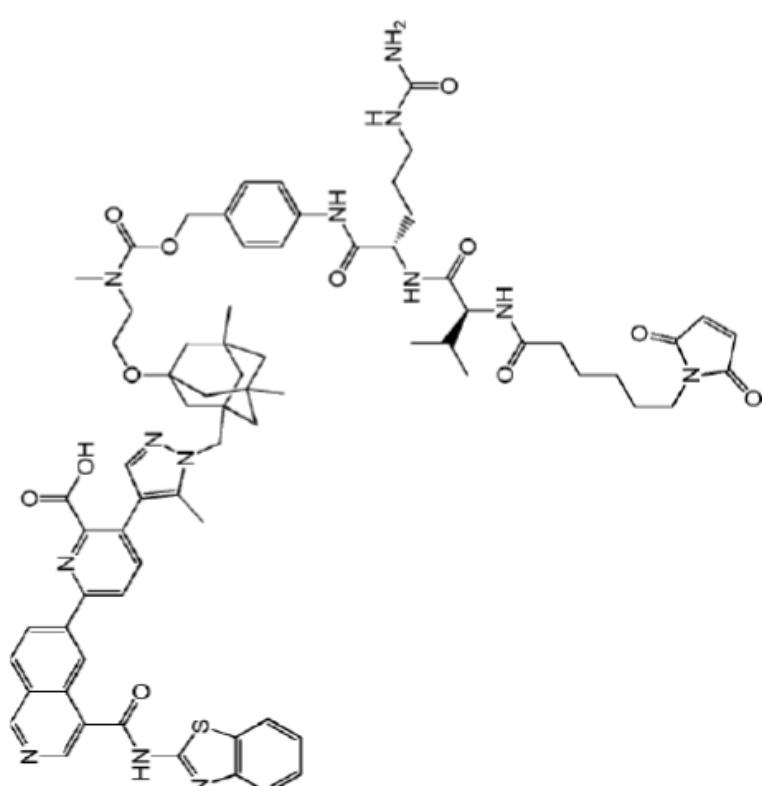
Ejemplo Núm.	Código del Síntón	Estructura del Síntón	
2.130	TX		
2.166	AAA		

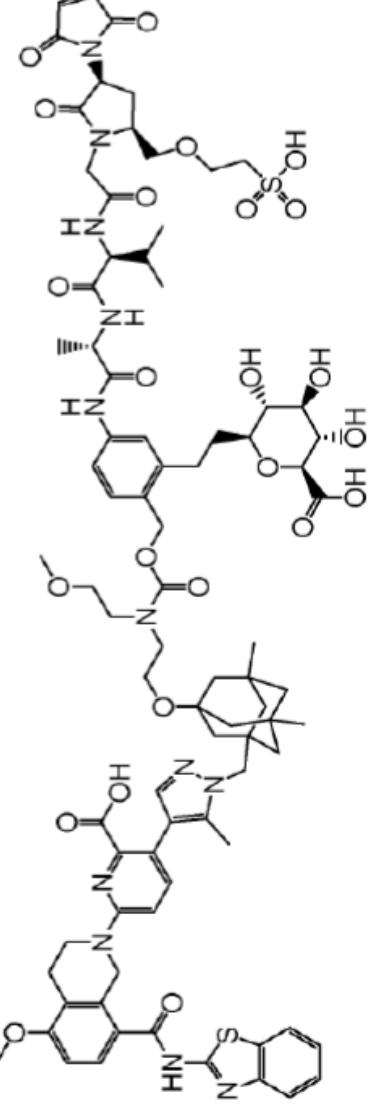
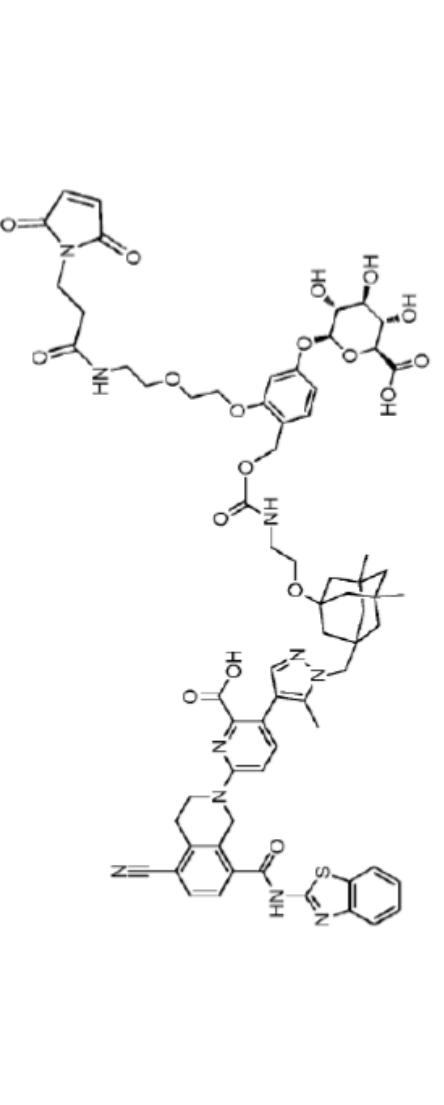
Ejemplo Núm.	Código del Sintón	Estructura del Sintón (continuación)	
2.167	AAD		
2.177 (control)	LB		

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

Ejemplo Núm.	Código del Sintón	Estructura del Sintón	
2.180 (control)	ZT		
2.181 (control)	XXW		

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

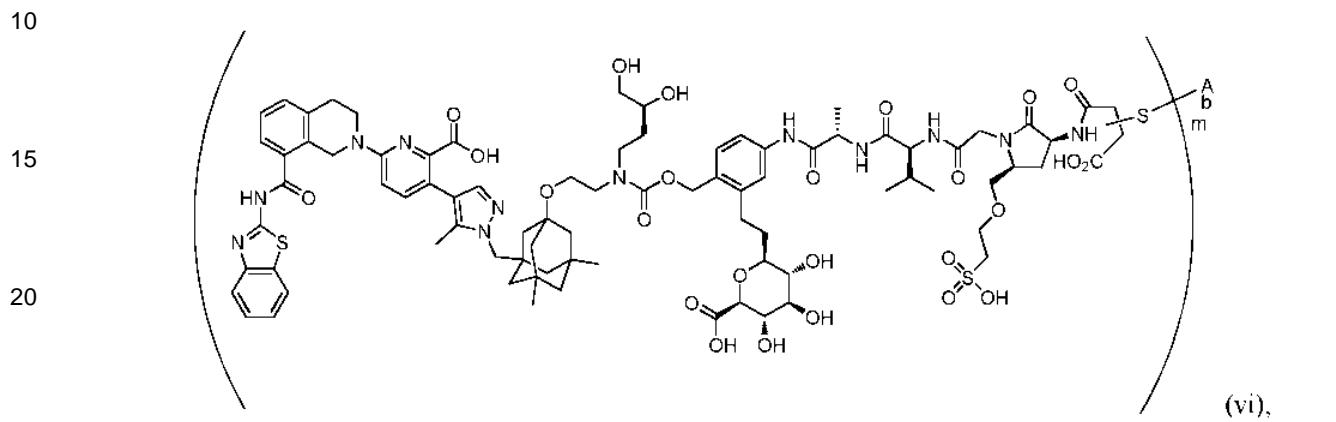
Ejemplo Núm.	Código del Síntón	Estructura del Síntón
	2.183 (control)	

Ejemplo N.º	Código del Síntón	Estructura del Síntón	
2.184 (control)	YG		
	KZ		2.185 (control)

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:

5 ácido 6-(8-(benzo[d]tiazol-2-ilcarbamoil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-3-1-((3-(2-(((2S,3R,4R,5S,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxitetrahidro-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

45 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.

50 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:

60 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.

10 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 (IIf).



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.

25 III. Purificación de los ADC anti-B7-H3

30 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.

5 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 une sustancialmente a la resina y fluya a través de la resina, y la especie de ADC no deseada se une 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 une 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.

20 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.

25 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.

30 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 (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); Phenyl Sepharose™ de Alto Rendimiento (Pharmacia LKB Biotechnology, AB, Suecia); Octil Sepharose™ de Alto Rendimiento (Pharmacia 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).

45 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).

50 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.

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

65 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.

- 5 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.
- 10 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).
- 15 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 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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 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.
- 35 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).
- 40 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,
- 45 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.
- 50 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 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.
- 55 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).
- 60 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,
- 65 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.

5 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.

20 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 30 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.

35 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 40 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.

45 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 50 en la presente descripción.

55 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.

60 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 65 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 5 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 quimoprotectores, hormonas, agentes antihormonales, 10 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. 15 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 20 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 25 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 30 un inhibidor de la nicotinamida fosforribosiltransferasa (NAMPT), así como también los siguientes agentes:

	Agente Anticancerígeno	Comentarios	Ejemplos
35	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) Matuzumab (EMD72000) Erbitux® / Cetuximab (Imclone) Vectibix® / Panitumumab (Amgen) mAb 806 Nimotuxumab (TheraCIM) AVEO (AV299) (AVEO) AMG102 (Amgen) 5D5 (OA-5d5) (Genentech) H244G11 (Pierre Fabre) Ab # 14 (MM 121-14) Herceptin® (Trastuzumab; Genentech) 1B4C3; 2D1D12 (U3 Pharma AG) NVP-AEW541-A BMS-536,924 (1H-benzoimidazol-2-il)-1H-piridin-2-ona) BMS-554,417 Cycloligan TAE226 PQ401
40			
45		Anticuerpos que se unen al EGFR; Las mutaciones que afectan la expresión o la actividad del EGFR podrían provocar cáncer	
50		Anticuerpos que se unen a cMET (factor de transición epitelial mesoquimal); miembro de la familia MET del receptor tirosina quinasa)	
55		Anticuerpos anti-ErbB3	
60	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	
65			

(continuación)

	Agente Anticancerígeno	Comentarios	Ejemplos
5	Moléculas Pequeñas Dirigidas al EGFR	EGFR; La sobreexpresión o las mutaciones que afectan la expresión o la actividad del EGFR podrían provocar cáncer	Iressa® / Gefitinib (AstraZeneca) 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) PHA665752
10			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)
15			5-azacitidina 6-mercaptopurina (mercaptopurina, 6-MP) Azatioprina / Azasan® (AAIPHARMA LLC)
20	Moléculas Pequeñas Dirigidas a los Antimetabolitos de Cmet	cMET (factor de transición epitelial mesenquimal); miembro de la familia MET de receptores tirosina quinasa)	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) Ribonucleótido Reductasa Inhibidor (RNR) Ciclofosfamida / Cytoxan (BMS) Neosar (TEVA) Ifosfamida / Mitoxana® (ASTA Medica) Tiotepa (Bedford, Abraxis, Teva) BCNU → 1,3-bis(2-cloroethyl)-1-nitrosourea CCNU1, -(2-cloroethyl)-3-ciclohexil-1-nitrosourea (metil CCNU) Hexametilmelamina (Altretamine1 HMM) / Hexalen® (MGI Pharma Inc.) Busulfán / Myleran (GlaxoSmithKline) Procarbazina HCL / Matulane (Sigma Tau Pharmaceuticals, Inc.) Dacarbazina (DTIC) Clorambucil / Leukara® (SmithKline Beecham)
25			
30			
35			
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.	
45			
50			
55			
60			
65			

(continuación)

Agente Anticancerígeno	Comentarios	Ejemplos	
5	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.	Carboplatino/Paraplatino (BMS) Oxaliplatino/Eloxitan® (Sanofi-Aventis US)
10			Doxorrubicina HCL / Doxil® (Alza) Citrato de daunorrubicina / Daunoxome® (Gilead) Mitoxantrona HCL / Novantrone (EMD Serono) Actinomicina D Etopósido / Vepesid® (BMS) / Etopophos® (Hospira, Bedford, Teva Parenteral, etc.)
15			Topotecán HCL / Hycamtin® (GlaxoSmithKline)
20			Tenipósido (VM-26) / Vumon® (BMS)
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.	Irinotecán HCL (CPT-II) / Camptosar® (Pharmacia y Upjohn) 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.)
30			Ixabepilona / IXEMPRA™ (BMS)
35			Mesilato de imatinib / Gleevec (Novartis)
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.	Malato de sunitinib / Sutent® (Pfizer) Tolisato de sorafenib / Nexavar® (Bayer) Clorhidrato de nilotinib monohidratado / Tasigna® (Novartis), Osimertinib, Cobimetinib, Trametinib, Dabrafenib, Dinaciclib
45			L-asparaginasa / Elspar® (Merck & Co.)
50	Inhibidores de la síntesis de proteínas	Induce la apoptosis celular	
55	Agentes inmunoterapéuticos	Inducen a los pacientes con cáncer a exhibir una respuesta inmune	Interferón alfa Inhibidor de la Angiogénesis / Avastin® (Genentech) IL-2 → Interleucina 2 (Aldesleucina) / 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) Keytruda® (pembrolizumab; Merck) Citrato de toremifeno / Fareston® (GTx, Inc.) Fulvestrant / Faslodex® (AstraZeneca) Raloxifeno HCL / Evista® (Lilly) Anastrazol / Arimidex® (AstraZeneca) Letrozol / Femara® (Novartis) Fadrozol (CGS 16949A) Exemestano / Aromasin® (Pharmacia y Upjohn) Acetato de leuprolida / Eligard® (QTL EE. UU.) Lupron® (TAP Pharm) Acetato de goserelina / Zoladex® (AstraZeneca) Pamoato de triptorelina / Treistar® (Watson Labs) Buserelina / Suprefact® (Sanofi Aventis) Nafareolina / Synarel® (Pfizer) Cetrorelix / Cetrotide® (EMD Serono) Bicalutamida / Casodex® (AstraZeneca) Nilutamida / Nilandron® (Aventis Pharm.) Acetato de megestrol / Megace® (BMS) Análogos de la somatostatina (acetato de octreótido / Sandostatin® (Novartis) Prednisolona Dexametasona / Decadron® (Wyeth) Ketoconazol
10		
15		
20	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.	
25		
30		
35		
40		
45	Glucocorticoides	Fármacos antiinflamatorios usados para reducir la hinchazón que causa el dolor por cáncer.
50	Inhibidores aromáticos Inhibidores de mTOR	Incluye imidazoles 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.
55		Sirolimus (rapamicina) / Rapamune® (Wyeth) Temsirolimus (CCI-779) / Torisel® (Wyeth) Deforolimus (AP23573) / (Ariad Pharm.) Everolimus (RAD001) / Certican® (Novartis)
60		
65		

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.

- 5 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-Welcome), Rituxan (IDEA/Genentech/Hoffman la Roche), Mylotarg (Wyeth), Campath (Millennium), Zevalin (IDEA 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.
- 10 15 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 20 presente descripción pueden usarse en una terapia de combinación con venetoclax para tratar el cáncer.
- 25 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 visfatinina) 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.
- 30 35 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.
- 40 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.
- 45 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, ENBREL)); 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 5 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).
- 10 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 15 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.
- 20 [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 25 temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.
- 30 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 35 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.
- 40 45 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 50 intervalos de dosificación establecidos en la presente descripción son únicamente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.
- 55 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 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.

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

20 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 protéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferon, 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.

35 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.

45 VI. Composiciones Farmacéuticas

50 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.

60 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 sialísticas, 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.* 71:105); 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-hidroxietilo), poli(metacrilato de metilo), poli(ácido acrílico), poli(etileno-co-acetato de vinilo), poli(ácido metacrílico), poliglicólicos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(alcohol vinílico), poliacrilonamida, poli(etenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicólicos) (PLGA) y poliortoésteres. En una modalidad preferida, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviadas, 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," *Proc. 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, 5 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.
- 10 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, díclorodifluorometano, triclorofluorometano, díclorotetrafluoroetano, 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 15 (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.
- 20 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); 25 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 30 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, 35 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.
- 40 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 45 administración de fármacos pulmonares Alkermes AIR® (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).
- 45 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, 50 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.
- 55 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).
- 60 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-ethylaminoetanol, 65 histidina, procaína, 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 Hylanex® (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 fluidex 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 etilenvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, 20 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.

55 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 intermedios 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

5 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

15 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-dimetiltriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)metil)-1H-pirazol

25 A una solución del Ejemplo 1.1.2 (8,0 g) en tolueno (60 ml) se le añadió 1H-pirazol (1,55 g) y cianometilentríbutilfosforano (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-il)metil}triciclo[3.3.1.1^{3,7}] dec-1-il}oxi}etanol

30 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]triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il}oxi}etanol

40 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]triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il}metil}-4-yodo-5-metil-1H-pirazol

50 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)⁺.

55 1.1.9 Ácido 6-fluoro-3-bromopicolínico

60 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.

65 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 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 hidrocloruro 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 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)⁺.

15 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]dicloropaladio(II) (205 mg) en acetonitrilo (30 ml) se le añadió trietilamina (3 ml) y pinacolborano (2 ml) y la mezcla se agitó a refljo 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 en gel de sílice, mediante la elución con acetato de etilo al 20 % en hexano, proporcionó el compuesto del título.

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

35 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.

45 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.

55 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.

65 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

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.

5 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

10 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.

15 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-10λ⁶-tia-13-aza-3-silapentadecan-15-ilo)oxi]triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il]piridin-2-carboxilato de terc-butilo

20 A una solución del Ejemplo 1.2.7 (500 mg) en N,N-dimetilformamida (8 ml) se le añadió 4-((terc-butildifenilsil)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.

25 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}triciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)metil)-5-metil-1H-pirazol-4-il]piridin-2-carboxílico

30 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-d₆) 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)⁺.

35 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

40 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

45 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-(metoxicarbonil)naftalen-2-il) picolinato de terc-butilo

55 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)palladio(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-(metoxicarbonil)naftalen-2-il)picolinato de terc-butilo

65 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)⁺.

5 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

10 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)⁺.

15 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

20 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)⁺.

25 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-ilcarbamoil)naftalen-2-il)picolinato de terc-butilo

30 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)⁺.

35 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-ilcarbamoil)naftalen-2-il)picolinato de terc-butilo

40 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)⁺.

45 1.43.7 Ácido 6-[8-(1,3-benzotiazol-2-ilcarbamoil)naftalen-2-il]-3-{1-[(3,5-dimetil-7-{2-[(2-sulfoetil)amino]etoxi}triciclo[3.3.1.1^{3,7}] dec-1-il)metil]-5-metil-1H-pirazol-4-il}piridin-2-carboxílico

50 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. Despues 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)⁺.

55 1.85 Síntesis del ácido 6-[8-(1,3-benzotiazol-2-ilcarbamoil)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il]-3-(1-[(3- (2-[(3S))-3,4-dihidroxibutil]amino)etoxi]-5,7-dimetiltriciclo[3.3.1.1^{3,7}]dec-1-il)metil]-5-metil-1H-pirazol-4-il)piridina-2-carboxílico (W2.85)

60 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). Despues 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)bencilo)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-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. Despues 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.

2.119.1 (3R,7aS)-3-feniltetrahidropirrolo[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 refluo 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)⁺.

2.119.2 (3R,6R,7aS)-6-bromo-3-feniltetrahidropirrolo[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-feniltetrahidropirrolo[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-feniltetrahidropirrolo[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-feniltetrahidropirrolo[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)⁺.

10 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 tercbutilclorodimetilsilano (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 chromatografía 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)⁺.

20 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 chromatografía 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)⁺.

30 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 tetrabutilamonio (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 chromatografía 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)⁺.

40 2.119.11 2-((3S,5S)-5-((2-((4-((terc-butildimetilsilil)oxi)-2,2-dimetilbutoxi)sulfonil)etoxi)metil)-3-(dibencilamino)-2-oxopirrolidin-1-il)acetato de terc-butilo

45 A una mezcla del Ejemplo 2.119.10 (4,7 g) en dimetilsulfóxido (14 ml) se le añadió una mezcla de 4-((terc-butildimetilsilil)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 chromatografía 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)⁺.

50 2.119.12 2-((3S,5S)-3-amino-5-((2-((4-((terc-butildimetilsilil)oxi)-2,2-dimetilbutoxi)sulfonil)etoxi)metil)-2-oxopirrolidin-1-il)acetato de terc-butilo

55 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)⁺.

60 2.119.13 Ácido 4-(((3S,5S)-1-(2-(terc-butoxi)-2-oxoetil)-5-((2-((4-((terc-butildimetilsilil)oxi)-2,2-dimetilbutoxi)sulfonil)etoxi)metil)-2-oxopirrolidin-3-il)amino)-4-oxobut-2-enoico

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[3.3.1.13,7]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-azabenzotiazol-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-dihidroisoquinolin-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)etil]-L-gulónico (Síntón 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-ethinil-tetrahidro-2H-piran-2-ol

A una mezcla de etiniltrimetsilano (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), 5 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 NaHCO₃ acuosa saturado (250 ml). La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente, se extrajo con acetato de etilo (3 x 300 ml), se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró al vacío para dar el compuesto del título. MS (ESI) m/e 659 (M+Na)⁺.

10 2.123.3 trimetil(((3S,4R,5R,6R)-3,4,5-tris(benciloxi)-6-(benciloximetil)-tetrahidro-2H-piran-2-il)etinil)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 NaHCO₃ acuosa 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 MgSO₄, 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)⁺.

20 2.123.4 (2R,3R,4R,5S)-3,4,5-tris(benciloxi)-2-(benciloximetil)-6-etinil-tetrahidro-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. Despues, el residuo se distribuyó entre agua y diclorometano. Los extractos se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, 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-etinil-tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triiltriacetato

30 30 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 NaHCO₃. La mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 500 ml), se secó sobre Na₂SO₄, 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)⁺.

35 35 2.123.6 (3R,4R,5S,6R)-2-etinil-6-(hidroximetil)-tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triol

40 40 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)⁺.

45 45 2.123.7 Ácido (2S,3S,4R,5R)-6-etinil-3,4,5-trihidroxi-tetrahidro-2H-piran-2-carboxílico

50 50 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 NaHCO₃. 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 mezcla acuosa de NaHCO₃ (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 Na₂CO₃ sólido. Despues 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. Despues, 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.

60 60 2.123.8 (2S,3S,4R,5R)-6-etinil-3,4,5-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-carboxilato de metilo

65 65 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. Despues

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

- 5 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.
- 10 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-d₄) 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).
- 15

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

35 Se cargó un matraz de 3 bocas de 3 L secado a la llama con el Ejemplo 2.123.10 (51,9 g) y tetrahidrofuran (700 ml). La mezcla se enfrió en un baño de hielo a 0,5 °C y se añadió gota a gota el complejo de boranotetrahidrofuran (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.

50 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-butildimethylsilyl)oxi)metil)-3-yodoanilina

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

5 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.

10 2.123.14 Ácido (S)-2-(((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-3-metilbutanamido)propanoico

15 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)⁺.

20 2.123.15 (9H-fluoren-9-il)metil((S)-1-(((S)-1-((4-((terc-butildimetsilil)oxi)metil)-3-yodofenil)amino)-1-oxopropan-2-il)amino)-3-metil-1-oxobutan-2-il)carbamato

25 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)⁺.

30 2.123.16 (2S,3S,4R,5S,6S)-2-((5-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilo)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)-2-((tercbutildimetsilil)oxi)metil)fenil)etinil)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triiltriacetato

35 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-etyl-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)⁺.

45 2.123.17 (2S,3S,4R,5S,6S)-2-((5-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilo)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)-2-((tercbutildimetsilil)oxi)metil)fenetil)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triiltriacetato

50 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)⁺.

55 2.123.18 (2S,3S,4R,5S,6S)-2-((5-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilo)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)-2-(hidroximetil)fenetil)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triiltriacetato

60 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)⁺.

65 2.123.19 (2S,3S,4R,5S,6S)-2-((5-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilo)amino)-3-metilbutanamido)propanamido)-2-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenetil)-6-(metoxicarbonil)tetrahidro-2H-piran-3,4,5-triiltriacetato

65 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-etyl-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-(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-trihidroxitetrahidro-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 (Síntón 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,SS,6S)-6-carboxi-3,4,5-trihidroxitetrahidro-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 (Síntón 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-trihidroxitetrahidro-2H-piran-2-il)etil)bencil)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

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 trajeron 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 humana, 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
40	Ab1	2,10	1,79	299,0
	Ab2	1,70	1,50	1,00
	Ab3	1,66	1,42	0,94
	Ab4	4,06	3,10	1,75
	Ab5	2,71	1,91	6,01
	Ab6	1,59	1,53	Sin unión
	Ab7	3,22	2,67	67,13
	Ab8	3,83	8,63	193,0
	Ab9	4,49	259,0	0,72
	Ab10	3,97	4,46	3,80
	Ab11	23,40	2,03	568,60
	Ab12	3,88	6,71	8,72
	Ab13	1,94	4,12	25,80
	Ab14	3,03	2,97	102,2
	Ab15	5,37	6,52	4,61
	Ab16	3,94	4,28	318,7
	Ab17	2,75	2,60	2,39
	Ab18	5,98	6,49	Sin unión

60 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).

5 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

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

30 Se usaron ensayos de unión por parejas realizados en instrumentos Biacore T200 SPR para determinar el agrupamiento relativo de epítopos 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 epítopos, que describe la diversidad relativa del epítopo de la B7-H3 humana y el solapamiento para una serie de mAb anti-B7-H3 identificados en la presente descripción.

35 Los grupos de epítopos se representan como óvalos individuales, algunos de los cuales se superponen entre sí. Los anticuerpos en diferentes grupos de epítopos pueden unirse a B7-H3 simultáneamente y probablemente se unan a diferentes epítopos, mientras que los anticuerpos dentro de un grupo de epítopo dado no pueden unirse a B7-H3 simultáneamente y probablemente se unan a epítopos 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.

40 Materiales y métodos: Cinéticas de unión

45 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 acoplarón 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).

60 Materiales y métodos: Agrupación de epítopos

65 Se usaron ensayos de unión por parejas realizados en instrumentos Biacore T200 SPR para determinar el agrupamiento relativo de los epítopos 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 epítopos 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 isótipo o cóctel de mAb de isótipo 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_{mAb}/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 epítopos.

15 Ejemplo 5: Generación de Anticuerpos Químicos 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 químicos. La Tabla 4 más abajo proporciona las secuencias de aminoácidos de la región variable para los hibridomas quimerizados de ratón.

25 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		QVQLQQPGAEVKPGASVKLSCKASGY TFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGMIHPD SGTTNYNEKFRSKATLTVDKSSSTAYM QLSSLTSEDSAVYYCAVYYGSTYWF 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	YYGSTYWF DVVMTQTPLSLPVSLGDQAYISCRSSQ SLVHINGNTYLNWYRQKPGQSPKLLIY KVSNRFSGVPDFRSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGSGTK LEIK
5	chAb2	VL		RSSQSLVHINGNTYLNWYRQKPGQSPKLLIY KVSNRFSGVPDFRSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGSGTK LEIK
6	chAb2	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 5	RSSQSLVHINGNTYLNWYRQKPGQSPKLLIY KVSNRFSGVPDFRSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDLGVYFCSQSTHFPFTFGSGTK LEIK
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		QVQLQQPGAEVKPGASVKLSCKASGY TFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGLIHPD SGSTNYNEMFKNKATLTVDRSSSTAYV QLSSLTSEDSAVYFCAGGGRLYFDYWG QGTTLT VSS
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		DVVMTQTPSLPVSLGDQASISC RSSQ SLVHSNGDTYLRWYLQKPGQSPKLLIY KVSNRFSGVPDFSGSGSGTDFTLKIT RVEAEDLGVYFC SQSTHVPYT FGGGTK LEIK
14	chAb3	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 13	RSSQSLVHSNGDTYLR
7	chAb3	CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 13	KVSNRFS
15	chAb3	CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 13	SQSTHVPYT
16	chAb4	VH		QVQLQQPGAEVKGASVQLSCKASGY SFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGMIHPN SGSNNYNEKFKS KATLTVDKSSNTAYM QLSSLTSEDSAVYYCAR RLGLHF DYWG 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	MIHPNSGSNNYNEKFKS
19	chAb4	CDR-H3	Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 16	RLGLHF DY
20	chAb4	VL		DIVMTQSQKFMSTPVGDRVSITC KASQ NVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIY SASNR YTGPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSE DLADYFC QQYSSY PYT FGGGTKLEIK
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	QQYSSY PYT
24	chAb18	VH		QVQLQQSAELARPGASVVKMSCKASGY SFTSYTIHWVKQRPQGLEWIGYINPN SRNTDYNQKFKD ETTLTADRSSSTAYM QLISLTSEDSAVYYCARYSGSTPYWYF DVWGAGTTVTVSS
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		QIVLTQSPAILSASPGEKVTMTC RASS SVSYMNWYQQKPGSSPKPWIY ATSNLA SGVPARFSVSVSGTSHSLTISRVEAED AATYYC QQWSSNPLT F GAGTKLELK
29	chAb18	CDR-L1	Residuos 24-33 de SEQ ID NO: 28	RASSSVSYM
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		DVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVT GY SITSGYSWHWIRQFPGNKLEWMGYIHS SGSTNYNPSLKS RISINRDTSKNQFFL QLNSVTTEDTATYYCAG YDDYFEY 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 NVGFNVAWYQQKPGQSPKALIY SASYR YS GVPDFRTGSGSGTDFLTISNVQSE 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		EVKLVEGGGLVKPGGSLKLSACAAS GF TFSSYGM SWVRQTPEKRLEWVAT ISGG GTNTYYPDSVEGRFT ISRDNAKNFLY QMSSLRSEDTALYYCAR HYGSQTMDY W GQGTSVTVSS
49	chAb14	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 48	GFTFSSYGM
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	HYGSQTMDY
52	chAb14	VL		DIQMTQSPASLSASVGETVTITC RTSG NIHNYLT WYQQKQGKSPQLLVY NAKTL ADGVPSRFSGSGSGTQFSLKINS LQPE DFGSYYC QHFW SIMWTFGGGTKLEIK
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	QHFW SIMWT
56	chAb6	VH		QVQLQQSGAELMKGASVKISCKAT GY TFSRYWIE WVKQRPQGHGLEWIG EILPG SGSTNYNEKF KGKATFTADTSSNTAYM QVSSLTSEDSAVHYCAR RGYGYV PYAL DYWGQGTSVTVSS
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	EILPGSGSTNYNEKF KG
59	chAb6	CDR-H3	Residuos 99-110 de SEQ ID NO: 56	RGYGYV PYALDY

(continuación)

SEQ ID NO:	Clon	Región de la Proteína	Residuos	Secuencia de Aminoácidos
60	chAb6	VL		EIQMTQTSSLSASLGDRVTISC RASQ DISNSLNWYQQKPDGTVNLLIYYTSRL YSGVPSRSGSGSGTDYSLTISNLEQE 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		EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSG F TFTNYYMSWVRQPPGKALEWLGFIRNK ANDYTTEYSASAVKGRTFISRDNSQSIL YLQMNTRRAEDSATYYCARESPGNPFA YWGQGTIVTVSA
65	chAb11	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 64	GFTFTNYYMS
66	chAb11	CDR-H2	Residuos 50-68 de SEQ ID NO: 64	FIRNKANDYTTEYSASAVKG
67	chAb11	CDR-H3	Residuos 101-109 de SEQ ID NO: 64	ESPGNPFAY
68	chAb11	VL		DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMTC KSSQ SLLNSGTQKNFLTWYQQKPGQPPKLLI YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTI SSVQAEDLAVYFCQNDYIYPLTFGAGT KLELK
69	chAb11	CDR-L1	Residuos 24-40 de SEQ ID NO: 68	KSSQSLNSGTQKNFLT
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		EVKLLESGGGLVQPGGSLKLS CAASGF DFSRWMSWVRQAPGKGLEWIGEEINPD SSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYL QMSKVRSEDTALYYCARPGFGNYIYAM DYWGQGTSVTVSS
73	chAb16	CDR-H1	Residuos 26-35 de SEQ ID NO: 72	GFDFSRWMS
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		DIQMTQTSSLSASLGDRVTINC RASQ DISNFLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRL YLGVPSRSGSGSGTDYSLTISNLEQE 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 Químicos Anti-B7-H3

Para generar anticuerpos químicos 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 μ l/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 μ m 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 químicos 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 químicos anti-B7-H3.

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

Nombre del Ab Químérico	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 $2,5 \times 10^6$ células/ml en tampón FACS. Se añadieron 100 μ l de células/pocillo a una placa de 96 pocillos de fondo redondo. 10 μ L 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 μ l 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 μ l 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 Químicos anti-B7-H3 como Conjugados Anticuerpo-Fármaco para la Inhibición de Bcl-xL

Se conjugaron nueve anticuerpos químicos 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 químera anti-B7-H3 contra la célula de cáncer de mama HCC38 que expresa la B7-H3 humana.

TABLA 6: Caracterización *in vitro* de conjugados químicos-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
5	chAb2-CZ	Precipita	2,60	4,77	A	1,0	5,9
10	chAb3-CZ	Claro	0,65	0,17	A	4,6	6,3
15	chAb4-CZ	Claro	0,54	0,26	A	1,4	5,7
20	chAb18-CZ	Claro	1,78	0,28	A	2,3	4,3
25	chAb13-CZ	Claro	1,49	0,18	A	3,8	8,3
30	chAb11-CZ	Claro	1,12	2,34	A	3,2	5,6
35	chAb6-CZ	Precipita	0,56	80,98	A	1,3	0,5
40	chAb16-CZ	Precipita	0,62	21,89	A	0,9	2,3
45	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 desecharable (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/vacio 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 μ l 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 μ l 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 μ l 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 μ l, 1 ml de volumen total). El MDT aspiró y dispensó DPBS (150 μ l) 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 μ l 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 μ l, 1 ml de volumen total). El MDT aspiró y dispensó 100 μ l 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 μ l 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.

20 *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.

25 Se humedeció previamente una placa de filtro Pall 5052 con 100 μ l 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 μ L) 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 μ l 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 μ l de 5x DPBS a la placa de recogida para su uso posterior. Se preparó el anticuerpo reducido (2 mg) como una solución en (200 μ l) 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 μ l 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 μ l dentro del pocillo.

30 40 Despues de cinco minutos, la mezcla de reacción de conjugación (230 μ l) 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 μ l 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 μ l, 1 ml de volumen total). El MDT aspiró y dispensó DPBS (150 μ l) 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 μ l 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 μ l, 1 ml de volumen total). El MDT aspiró y dispensó 100 μ l 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 μ l 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.

45 50 55 *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.

60 65 *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.

5 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.

10 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.

15 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 centrífuga 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.

20 **50** 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.

55 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 Bioresorces, 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 deconvoluciona 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.

5 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 10 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 (síntón TX, peso molecular 1736 Da) al anticuerpo huAb13v1 completamente reducido.

Metodología general de la cromatografía de exclusión por tamaño

20 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*

30 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 35 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

40 De los nueve anticuerpos químéricos probados *in vitro* conjugados con los síntones 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 45 como control, tanto como anticuerpo desnudo como ADC (conjugado al mismo síntón (CZ) que los anticuerpos chAb3, chAb18 y chAb13). MSL109 es un control no dirigido a un isótipo 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).

50 Tabla 7: Eficacia *in vivo* del anticuerpo químérico 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

65 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 ($TGI_{máx}$), durabilidad (TGD) de la respuesta terapéutica. $TGI_{máx}$ es la inhibición máxima del crecimiento tumoral durante el experimento. La inhibición del crecimiento tumoral se calcula por $100^*(1-T_v/C_v)$ 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 $100^*(T_t/C_t-1)$ 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 químérico 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 ligera (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 ligera 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 eIGHJ6*01 para construir las secuencias aceptoras de la cadena pesada
- IGKV1-9*01 eIGKJ2*01 para construir las secuencias aceptoras de la cadena ligera
- IGKV6-21*01 eIGKJ2*01 como aceptador de respaldo para la construcción de las cadenas ligera

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 ligera 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 ligera 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		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYSFTSYTIHWVRQAPGQGLEWMGY INPNSRNTDYNQKFKDRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYS GSTPYWYFDVWQGTTVTVSS
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		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYSFTSYTIHWVRQAPGQGLEWIGY INPNSRNTDYNQKFKDRRTLADRS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYS GSTPYWYFDVWQGTTVTVSS
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		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYSFTSYTIHWVRQAPGQGLEWMGY INPNSRNTDYAQKFQGRVTLTADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYS GSTPYWYFDVWQGTTVTVSS
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		DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC RA SSSVSYMNWYQQKPGKAPKLLIYAT SNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPEDFATYYC QQWSSNPLTFGQG 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		DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC RA SSSVSYMNWYQQKPGKSPKPWIYAT SNLASGVPSRFSVSGTEHTLTIS SLQPEDFATYYC QQWSSNPLTFGQG 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
5	31	huAb18VL.1a	CDR-L3	Residuos 88-96 de SEQ ID NO: 121 QQWSSNPLT
	122	huAb18VL.1b	VL	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC RA SSSVSYMNWYQQKPGKAPKPWIYAT SNLAS GVPSRFSVSGSGTEHTLTIS SLQPEDFATYYC QQWSSNPLT FGQG TKLEIK
10	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
15	31	huAb18VL.1b	CDR-L3	Residuos 88-96 de SEQ ID NO: 122 QQWSSNPLT
	123	huAb18VL.2	VL	EIVLTQSPDFQSVPKEKVTITC RA SSSVSYMNWYQQKPDQSPKLLIKAT SNLAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTIN SLEAEDAATYYC QQWSSNPLT FGQG TKLEIK
20	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
25	31	huAb18VL.2	CDR-L3	Residuos 88-96 de SEQ ID NO: 123 QQWSSNPLT
	124	huAb18VL.2a	VL	EIVLTQSPDFQSVPKEKVTITC RA SSSVSYMNWYQQKPDQSPKWIYAT SNLAS GVPSRFSVSGSGTDHTLTIN SLEAEDAATYYC QQWSSNPLT FGQG TKLEIK
30	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
35	31	huAb18VL.2a	CDR-L3	Residuos 88-96 de SEQ ID NO: 124 QQWSSNPLT
40				

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 eIGHJ6*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.11 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.

5

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:

10

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 VLb
huAb 18v9	huAb18 VH1a / huAb18 VL2a
huAb18v10	huAb18 VH1b / huAb18 VLb

25 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

55

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.

60

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

65

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.

5

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

20 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

25 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

35

IGHV1-69*06 IGHJ6

40

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASggftssyaisWVRQAPGQGLEWMGgiipfgtanyaqkfqgRTI
TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARxxxxxxxxWGGQTTTVSS (SEQ ID NO: 174);

45

donde xxxxxxxx representa la región CDR-H3.

IGKV2-28*01 IGKJ4

50

DIVMTQSPSLPVTPGEPASISCrssqslhsngynyldWYLQKPGQSPQLIYlgsnrasGVPDRFSGSGS
GTDFTLKISRVEAEDGVVYCYxxxxxxFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 175);

55

donde xxxxxxxx representa la región CDR-L3.

60

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.

65

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.

70

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.
 - El Ab3 VH.1a humanizado (huAb3VH.1a) es un diseño humanizado con base en huAb3VH.1 y contiene 8 5 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 10 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.
 - El Ab3 VL.1a humanizado (huAb3VL.1a) es un diseño humanizado con base en huAb3VL.1 y contiene 2 15 retromutaciones marco propuestas: I2V, Y87F.
 - El Ab3 VL.1b humanizado (huAb3VL.1b) es un diseño humanizado que contiene solo 1 retromutación marco propuesta: I2V.
- 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 QGLEWMGLI H PD S G ST NYNEM F K N RV T IT A D K ST T STAY M ELS SLRSEDTAVYYCAR GG R L Y F D Y WG Q GTT T TVSS
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 QGLEWIGL I HP D S G ST NYNEM F K N RAT L TV D R S T T AY V ELS SLRSEDTAVYYFCAGGG R L Y F D Y WG Q GTT T TVSS
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 QGLEWIGL I HP D S G ST NYNEM F K N RAT L TV D R S T T AY M ELS SLRSEDTAVYYCAGGG R L Y F D Y WG Q GTT T TVSS
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
5	128	huAb3VL.1	VL	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASI SCRSSQSLVHSNGDTYLRWYL QKPGQSPQLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYC SQSTHVPYT FGG GTKVEIK
10	14	huAb3VL.1	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 128 RSSQSLVHSNGDTYLR
15	7	huAb3VL.1	CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 128 KVSNRFS
20	15	huAb3VL.1	CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 128 SQSTHVPYT
25	129	huAb3VL.1a	VL	DVVMQTQSPLSLPVTPGEPASI SCRSSQSLVHSNGDTYLRWYL QKPGQSPQLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYFC SQSTHVPYT FGG GTKVEIK
30	14	huAb3VL.1a	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 129 RSSQSLVHSNGDTYLR
35	7	huAb3VL.1a	CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 129 KVSNRFS
40	15	huAb3VL.1a	CDR-L3	Residuos 94-102 de SEQ ID NO: 129 SQSTHVPYT
45	130	huAb3VL.1b	VL	DVVMQTQSPLSLPVTPGEPASI SCRSSQSLVHSNGDTYLRWYL QKPGQSPQLLIYKVSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYC SQSTHVPYT FGG GTKVEIK
50	14	huAb3VL.1b	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 130 RSSQSLVHSNGDTYLR
55	7	huAb3VL.1b	CDR-L2	Residuos 55-61 de SEQ ID NO: 130 KVSNRFS
60	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 inhibidor 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

5	ADC	Sec. Id. Número	Método de Conjugación	DAR por MS	% agr por SEC	FACS (Unión a hu B7-H3) EC50 (nM)	Afinidad de mAb desnudos (Biacore, K_D)	Citotoxicidad (línea celular HCC38 IC ₅₀) (nM)
10	chAb3-CZ	9, 13	A	3,8		0,61	1,90E-08	0,17
15	huAb3v1-CZ	125, 128	A	3,6	3,3	1,45	5,20E-10	0,53
20	huAb3v2-CZ	127, 128	A	3,8	10,1	0,73	6,90E-10	0,13
25	huAb3v3-CZ	126, 129	A	3,6	2,5	1,68	2,30E-10	9,22
30	huAb3v4-CZ	125, 130	A	3,1	3,1	n/a	5,70E-10	n/a
35	huAb3v5-CZ	127, 130	A	3,1	5,9	0,85	2,30E-10	0,17
40	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

DIVMTQSPLSLPVTGEPASISCrssqlvhsgndtylrWYLQKPGQSPQLIYkvsnrfsvGPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCsqsthvpytFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 128)

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

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

5 huAb3 VHlb

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASgytfssywmhWVRQAPGQGLEWIGlihpJsgstnynemfknRAT
LTVDRLSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAGgggrlyfdyWGQGTTVTVSS '(SEQ ID NO: 127)

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

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

15 donde (para VL y VH),

x = Todos los aminoácidos, excepto: M, C, N, D o Q.

z = Todos los aminoácidos, excepto: M, C, G, S, N o P.

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

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		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYTFSSYWMH WVRQAPGQGLE WIGLIHPWSG STNYNEMFKN RAT LTVDRLSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAG <u>GG</u> RLYFDYWGQGTTVTV 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		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLVHSSGDTYLR WYLQKPG QSPQLLIY KVSNRFS GVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY C SQSTHVPY T <u>FGGGT</u> KVEIK
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	SQSTHVPY T
131	huAb3v2.2	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYTFSSYWMH WVRQAPGQGLE WIGLIHPWSG STNYNEMFKN RAT LTVDRLSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAG <u>GG</u> RLYFDYWGQGTTVTV 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		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLVHSNQDTYLRWYLQKPG QSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDGVVYY CSQSTHVPYT FGGGTKVEIK
136	huAb3v2.2	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 135	RSSQSLVHSNQDTYLR
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		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYTFSSYWMH WVRQAPGQGLE WIGLIHPWSGSTNYNEMFKN RAT LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAGGGRLYFDYWGQGTTVTV SS
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	LIHPWSGSTNYNEMFKN
12	huAb3v2.3	CDR-H3	Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 131	GGRLYFDY
137	huAb3v2.3	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLVHSNQDTYLRWYLQKPG QSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDGVVYY CSQSTHVPYT FGGGTKVEIK
138	huAb3v2.3	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 137	RSSQSLVHSNQDTYLR
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		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYTFSSYWMH WVRQAPGQGLE WIGLIHPESGSTNYNEMFKN RAT LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAGGGRLYFDYWGQGTTVTV SS
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	LIHPESGSTNYNEMFKN
12	huAb3v2.4	CDR-H3	Residuos 99-106 de SEQ ID NO: 139	GGRLYFDY
133	huAb3v2.4	VL		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLVHSQDTYLRWYLQKPG QSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDGVVYY CSQSTHVPYT FGGGTKVEIK
134	huAb3v2.4	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 133	RSSQSLVHSQDTYLR
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		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLE WIGLIHPESGSTNYNEMFKN RAT LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAGGGRLYFDYWGQGTTVTV 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 RSSQSLVHSNNDTYLWYLQKPG QSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSQTDFTLKRISRVEAEDGVVYY CSQSTHVPYTFGGGTKEIK
136	huAb3v2.5	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 135	RSSQSLVHSNNDTYLW
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	SQSTHVPY
139	huAb3v2.6	VH		EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLE WIGLIHPESGSTNYNEMFKN RAT LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAGGGRLYFDYWGQGTTVTV 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 RSSQSLVHSNNDTYLWYLQKPG QSPQLLIYKVSNRFSGVPDRFSG SGSQTDFTLKRISRVEAEDGVVYY CSQSTHVPYTFGGGTKEIK
138	huAb3v2.6	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 137	RSSQSLVHSNNDTYLW
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	SQSTHVPY
141	huAb3v2.7			EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLE WIGLIHPISGSTNYNEMFKN RAT LTVDRSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAGGGRLYFDYWGQGTTVTV 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			DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLVHSSGDTYLRWYLQKPG QSPQLLIY KVSNRFS GVPDFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CSQSTHVPYTFGGGTKEIK
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 ASGYTFSSYWMH WVRQAPGQGLE WIGLIHPISGSTNYNEMFKN RAT LTVD RSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAG GGRLYFDY WGQGTTVTV SS
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		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLVHSNRDTYLRWYLQKPG QSPQLLIY KVSNRFS GVPDFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CQSTHVPYTFGGGTKEIK
136	huAb3v2.8	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 135	RSSQSLVHSNRDTYLR
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 ASGYTFSSYWMH WVRQAPGQGLE WIGLIHPISGSTNYNEMFKN RAT LTVD RSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCAG GGRLYFDY WGQGTTVTV SS
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		DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLVHSNQDTYLRWYLQKPG QSPQLLIY KVSNRFS GVPDFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CQSTHVPYTFGGGTKEIK
138	huAb3v2.9	CDR-L1	Residuos 24-39 de SEQ ID NO: 137	RSSQSLVHSNQDTYLR

(continuación)

SEQ ID NO:	Clon	Región de la Proteína	Residuos	Secuencia de Aminoácidos
5	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).

15 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.

20

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, κ_0)	Citotoxicidad (línea celular H847 IC ₅₀) (nM)
huAb3v2-CZ	127, 128	A	3,5		0,44	5,11	2,87	2,30E-09
huAb3v2.2-CZ	131, 135	A	0,7	1,8	0,10	5,29	3,68	Ajuste pobre
huAb3v2.3-CZ	131, 137	A	1,1	1,5	0,11	6,50	4,03	Ajuste pobre
huAb3v2.5-CZ	139, 135	A	3,4	15,6	0,13	5,14	4,86	-
huAb3v2.6-CZ	139, 137	A	3,3	15	0,09	5,64	3,31	5,30E-09
huAb3v2.8-CZ	141, 135	A	2,0	5,7	0,14	3,94	3,01	Ajuste pobre
huAb3v2.9-CZ	141, 137	A	2,7	4,3	0,16	6,16	4,64	Ajuste pobre

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) eIGHJ6*01 para construir las secuencias aceptoras de la cadena pesada
 - IGKV1-39*01 eIGKJ2*01 para construir las secuencias aceptoras de la cadena ligera
 - IGHV4-b IGHJ6

QVQLQESGPGGLVKPSETSLTCAVSgysissgyywgWIRQPPGKGLEWIGsiyhsgstyynpslksRVTISV
DTSKNQESI KI LSSVTAADTA VYYCARxxxxxxxxWQOGTTVTVSS (SEQ ID NO: 176)

donde xxxxxxxx representa la región CDR-H3.

IGKV1-39 IGKJ2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCrasqsisssylnWYQQKPGKAPKLLIYaasslqsGVPSRFSGSGSGTDETLTISIOPEDFATYYCxxxxxxxxxFQGQTKIEIK (SEQ ID NO: 177);

donde xxxxxxxx representa la región CDR-I 3

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		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQNVGFNVAVYQQKPGKAP KLLIY SASRYRSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYNWYPFTFGQGTKLEIK
37	huAb13VL.1	CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 143	KASQNVGFNV
38	huAb13VL.1	CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 143	SASRYRSG
39	huAb13VL.1	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 143	QQYNWYPFT
144	huAb13VL.1a	VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQNVGFNVAVYQQKPGKSP KALIY SASRYRSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFAEYFC QQYNWYPFTFGQGTKLEIK
37	huAb13VL.1a	CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 144	KASQNVGFNV
38	huAb13VL.1a	CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 144	SASRYRSG
39	huAb13VL.1a	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 144	QQYNWYPFT
146	huAb13VH.1	VH		EVQLQESGPGLVKPSETLSLTC AV GYSITSGYSWH WIRQPPKG GLEWIGYI HSSGSTNYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCAR YDDYFEYWGQGT 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	YIHSSGSTNYNPSLKS
35	huAb13VH.1	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 146	YDDYFEY
145	huAB13VL.1b	VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CKASQNVGFNVAVYQQKPGKAP KLLIY SASRYRSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPEDFATYFC QQYNWYPFTFGQGTKLEIK
37	huAb13VL.1b	CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 145	KASQNVGFNV
38	huAb13VL.1b	CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 145	SASRYRSG
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		EVQLQESGPGLVKPSETLSLTC AVTGYSITSGYSWHWIRQFPGN GLEWMGYIHSSGSTNYNPSLKS RISISRDTSKNQFFLKLSSVTA ADTAVYYCAGYDDYFEYWGQGT 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	YIHSSGSTNYNPSLKS
35	huAb13VH.1a	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 147	YDDYFEY
148	huAb13VH.1b	VH		EVQLQESGPGLVKPSETLSLTC AVSGYSITSGYSWHWIRQPPGN GLEWMGYIHSSGSTNYNPSLKS RITISRDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARYDDYFEYWGQGT 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	YIHSSGSTNYNPSLKS
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		EVQLQESGPGLVKPSETLSLC TGYSITSGYSWHWIRQFPGN GLEWMGYIHSSGSTNYNPSLKS RISISRDTSKNQFFLKLSSVTA ADTAVYYCAGYDDYFEYWGQGT TVTVSS
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	YIHSSGSTNYNPSLKS
35	huAb13v1	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 147	YDDYFEY
144	huAb13v1	VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKSPKALI YSASRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFAEYFCQQYNWYPF 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		EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAV SGYSITSGYSWHWIRQPPGKGLEW IGYIHSSGSTNYNPSLKS RVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYF EYWGQGTTVTVSS
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	YIHSSGSTNYNPSLKS
35	huAb13v2	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 146	YDDYF EY
143	huAb13v2	VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC K ASQNVGFNV A WYQQKPGKAPKLLI YSASYRYS GVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYC QQYNWYPF T FGQGTKLEIK
37	huAb13v2	CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 143	KASQNVGFNV A
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		EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAV SGYSITSGYSWHWIRQPPGKGLEW IGYIHSSGSTNYNPSLKS RVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYF EYWGQGTTVTVSS
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	YIHSSGSTNYNPSLKS
35	huAb13v3	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 146	YDDYF EY
144	huAb13v3	VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC K ASQNVGFNV A WYQQKPGKSPKALI YSASYRYS GVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFAEYFC QQYNWYPF T FGQGTKLEIK
37	huAb13v3	CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 144	KASQNVGFNV A
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		EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAV SGYSITSGYSWHWIRQPPGKGLEW IGYIHSSGSTNYNPSLKS RVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYF EYWGQGTTVTVSS
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		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKAPKLLI YSASRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYFCQQYNWYPF 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	SASRYRS
39	huAb13v4	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 145	QQYNWYPFT
147	huAb13v5	VH		EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAV TGYSITSGYSWHWIRQFPNGLEW MGYIHSSGSTNYNPSLKS RISISR DTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYC AGYDDYFEYWGQGTTVTVSS
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		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKAPKLLI YSASRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQYNWYPF 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	SASRYRS
39	huAb13v5	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 143	QQYNWYPFT
147	huAb13v6	VH		EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAV TGYSITSGYSWHWIRQFPNGLEW MGYIHSSGSTNYNPSLKS RISISR DTSKNQFFLKLSSVTAADTAVYYC AGYDDYFEYWGQGTTVTVSS
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		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKAPKLLI YSASRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYFCQQYNWYPF 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	SASRYRS
39	huAb13v6	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 145	QQYNWYPFT
148	huAb13v7	VH		EVQLQESGPGLVKPSETLSLCAV SGYSITSGYSW HWIROQPPNGLEW MGYIHSSGSTNYNPSLKS RITISR DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYF EY WGQGTTVTVSS
33	huAb13v7	CDR-H1	Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 148	GYSITSGYSW H
34	huAb13v7	CDR-H2	Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 148	YIHSSGSTNYNPSLKS
35	huAb13v7	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 148	YDDYFEY
143	huAb13v7	VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRV T ITC K ASQNVGFNVA WYQQKPGKAPKLLI YASRYRS GVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYYC QQYNWYPF T FGQG TKLEIK
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	SASRYRS
39	huAb13v7	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 143	QQYNWYPFT
148	huAb13v8	VH		EVQLQESGPGLVKPSETLSLCAV SGYSITSGYSW HWIROQPPNGLEW MGYIHSSGSTNYNPSLKS RITISR DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYF EY WGQGTTVTVSS
33	huAb13v8	CDR-H1	Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 148	GYSITSGYSW H
34	huAb13v8	CDR-H2	Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 148	YIHSSGSTNYNPSLKS
35	huAb13v8	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 148	YDDYFEY
144	huAb13v8	VL		DIQMTQSPSSLSASVGDRV T ITC K ASQNVGFNVA WYQQKPGKSPKALI YASRYRS GVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFAEYFC QQYNWYPF T FGQG TKLEIK
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	SASRYRS
39	huAb13v8	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 144	QQYNWYPFT
148	huAb13v9	VH		EVQLQESGPGLVKPSETLSLCAV SGYSITSGYSW HWIROQPPNGLEW MGYIHSSGSTNYNPSLKS RITISR DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYF EY WGQGTTVTVSS

(continuación)

SEQ ID NO:	Clon	Región de la Proteína	Residuos	Secuencia de aminoácidos
5	33	huAb13v9	CDR-H1	Residuos 26-36 de SEQ ID NO: 148
	34	huAb13v9	CDR-H2	Residuos 51-66 de SEQ ID NO: 148
	35	huAb13v9	CDR-H3	Residuos 99-105 de SEQ ID NO: 148
10	145	huAb13v9	VL	
				DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYFCQQYNWYPPF TFGQGTKLEIK
15	37	huAb13v9	CDR-L1	Residuos 24-34 de SEQ ID NO: 145
	38	huAb13v9	CDR-L2	Residuos 50-56 de SEQ ID NO: 145
	39	huAb13v9	CDR-L3	Residuos 89-97 de SEQ ID NO: 145

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

25 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

35	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		
40	chAb13-CZ	32, 36	-	-	0,26	6,27	18,35	5,7E-09	-
45	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
	huAb13v6-CZ	147, 145	3,6	7,3	0,14	5,83	12,95	Ajuste pobre	0,84

50 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.

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

60 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.

5 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.

10 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

15 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.

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

25 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.

30 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

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

45 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

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

60 El anticuerpo humanizado anti-B7-H3 huAb13v1 se conjugó con el inhibidor de Bcl-xL sinton 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	QVQLQQPGAEVKGASVQLSCKA SGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWI GMIHPDSGTTNYNEKFRSKATLTV DKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC AVYYGSTYWYFDVWGTGTTVTVSS
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	MIHPDSGTTNYNEKFRS
4	secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb2	YYGSTYWYFDV
5	Secuencia de aminoácidos de la VL de chAb2	DVVMQTPLSLPVSLGDQAYISCR SSQSLVHINGNTYLNHWYRQKPGQS PKLLIY KVSNRFS GVPDRFSGSGS GTDFTLKRISRVEAEDLGVYFC SQS THFPT EGSGTKEIK
6	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb2	RSSQSLVHINGNTYLN
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	QVQLQQPGAEVKGASVQLSCKA SGYTFSSYWMHWVKQRPGQGLEWI GLIHPDSGSTNYNEMFKNATLTV DRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC AGGGRLYFDYWGQGTTTVSS
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	GYTFSYYWMH
11	secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb3, huAb3VH.1, huAb3VH.1a y huAb3VH.1b	LIHPDSGSTNYNEMFKN
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	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCR SSQSLVHSNGDTYLRWYLNQKPGQS PKLLIY KVSNRFS GVPDRFSGSGS GTDFTLKRISRVEAEDLGVYFC SQS THVPYT EGGGTKEIK
14	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb3, huAb3VL.1, huAb3VL.1a y huAb3VL.1b	RSSQSLVHSNGDTYLR
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	QVQLQQPGAEVKGASVQLSCKA SGYSFTSYWMHWVKQRPGQGLEWI GMIHPNSGSNNYNEKFKSATLTV DKSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYC ARRLGLHFDYWGQGTTTVSS
17	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb4	GYSFTSYWMH
18	secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb4	MIHPNSGSNNYNEKFKS
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	DIVMTQSQKFMSTPGDRVSITCK ASQNVGTAWA WYQQKPGQSPKLLI YSASNRYTGVPDFRTGSGSGTDFT LTISNMQSEDLADYFCQQYSSYPY TFGGGT KLEIK
21	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb4	KASQNVGTAWA
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 SGYSFTSYTIH WVKQRPGQGLEWI 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 chAb18, huAb18VH.1, huAb18VH.1a y huAb18VH.1b	YSGSTPYWYFDV
28	secuencia de aminoácidos de la VL de chAb18	QIVLTQSPAILSASPGEKVTMTCR ASSSVSYMN WYQQKPGSSPKPWIY ATSNLAS GVPARFSVSVSGTSHSL 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	RASSVSYMN
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 TGYSITSGY SWHWIRQFPGNKLEW MGYI HSSG STNYNPSLKS RISINR DTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYC AG YDDYF EYWGQGTTLTVSS
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	GY SITSGY SWH
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	YI HSSG STNYNPSLKS
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 huAbR13v9	YDDYF

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
36	secuencia de aminoácidos de la VL de chAb13	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVC K A SQNVGFNVAWYQQKPGQQSPKALI Y S ASRYR S GVPDFRTGSGSGTDFT LTISNVQSEDLAEYFC Q QYNSYPF T FGSGTKLEIK
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 huAbR13v9	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	SASRYR S
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	EVQLVESGGGLVKGPGSLKLSCAA S GFTFSSYAMS W VRQTPEKRLEW V A TISSGTNYTYYPDSVKGRFTISR DNAKNTLYLQMTSLRSEDTAMYYC Q GRY S W I AYWGQGTLVTVSA
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	TISSGTNYTYYPDSVKKG
43	secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb12	QGRY S W I AY
44	secuencia de aminoácidos de la VL de chAb12	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCR A SKSVSTSDY S YM H WNQQKPGQPP KLLIY L ASN L ES G VPARFSGSGSG TDFTLN I HPVEEDAATYYC Q HSR E LL T FGAGTKLELK
45	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb12	RASKSVSTSDY S YM H
46	secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VL de chAb12 y chAb17	LASN L ES
47	secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb12	QHSRELLT
48	secuencia de aminoácidos de la VH de chAb14	EVKLVESGGGLVKGPGSLKLSCAA S GFTFSSY G MS W VRQTPEKRLEW V A TISGGGTNTYYPDSVEGRFTISR DNAKNFLY L QMS L RSEDTALYYC Q HYG S QTMDYWGQGTSVTVSS
49	Secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb14 y chAb8	GFTFSSY G MS
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	HYG S QTMDY
52	secuencia de aminoácidos de la VL de chAb14	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCR T SGNIHN Y LTWYQQ K Q G KSPQLLV YNAKTL A D G VPSRFSGSGSGTQFS LKINS L Q P EDFGSYYC Q H F WSIMW T FGGGT K LEIK
53	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb14	RTSGNIHN Y LT

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	QHFWSIMWTT
56	secuencia de aminoácidos de la VH de chAb6	QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKA TGYTFSRYWIEWVKQRPGLGLEWI GEILPGSGSTNYNEKFKGKATFTA DTSSNTAYMQVSSLTSEDSAVHYC ARRGYGYVPYALDYWGQGTSVTVS 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	EIQMTQTTSSLASLGDRVTISCR ASQDISNSLNLWYQQKPDGTVNLLI YYTTSRILYSGVPSRFSGSGSGTDS LTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPY TFFGGTKEIK
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	YTSRILYS
63	secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb6	QQGNTLPYT
64	secuencia de aminoácidos de la VH de chAb11	EVKLVEGGGLVQPGGSLRLSCAT SGFTFTNYYMSWVRQPPGKALEWL GFIRNKANDYTTEYSASVKGRFTI SRDNSQSILYLQMNTLRAEDSATY YCARESPGNPFAYWGQGTLVTVSA
65	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb11	GFTFTNYYMS
66	secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb11	FIRNKANDYTTEYSASVKKG
67	secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb11	ESPGNPFAY
68	secuencia de aminoácidos de la VL de chAb11	DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMTC SSQSLLNSGTQKNFLT WYQQKPGQ PPKLLIYWASTRESGVPDFRTGSG SGTDFLTISVQAEDLAVYFC QNDYIYPLTFGAGTKLELK
69	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb11	KSSQSLLNSGTQKNFLT
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	QNDYIYPLT
72	secuencia de aminoácidos de la VH de chAb16	EVKLVEGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFDTSRYWMSWVRQAPGKGLEWI GEINPDSSTINYTPSLKD DNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYC ARPFGFNYIYAMDYWGQGTSVTVS S
73	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb16	GFDFSRWMS
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	DIQMTQTTSSLASLGDRVTINC R A SQD I SNFLN W YQQKPDGTVKLLI Y Y T SRLYLGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEQEDIATYFC Q Q G NTLPP T FGGGTKLEIK
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 GY S ITSDYAWN W IRQFPGNRLEW MG H INYSGITNYNPSLKS R ISITR DTSKNQFFLQLYSVTTEDTATYFC A RR S LFYYYGSSLYAMDYWGQGTS VTVSS
81	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VH de chAb10	GY S ITSDYAWN
82	secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de chAb10	HINYSGITNYNPSLKS
83	secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb10	RSLFYYYGSSLYAMDY
84	secuencia de aminoácidos de la VL de chAb10	DVVM T QSPFSLPVSLGQAS I SCR S SQ S LV H SNGNTYL H WY L Q K PGQS PKLLI Y KVS N RF S GVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEA E DLGVYFC S Q S T HP W T F GGGT K LEIK
85	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de 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	EVQLVESE G ENLV K PGGSL L SCAA S GF S FR G Y G MSW V RQTPD K RLEW V A A I ST G GN Y TYY P DSV Q GRFT I SR DNANNTLY L Q M SSL K SEDTAMYYC A RR G GN Y AG F AY W G Q GT L TV S A
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	A I ST G GN Y TYY P DSV Q G
90	secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb7	RGGNYAGFAY
91	secuencia de aminoácidos de la VL de chAb7	DIQMTQSPASL S SV G ET T IT C R P SE N I Y SN L A W YQQ K Q G KSP Q LL V Y A AT N L A D G V P SR F SG S GT Q Y S LK I NSL Q SE D FG T YYC Q HFW G TP F T FG S GT K LEIK
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 SGFTFSSYGM SWVRQTPEKRLEWV ATISGGGN TYCPDSVKGRFTISR DNAKNNLYLQMSSLRSEDTALYYC TR QRGYDYHYAMDF WGQGTSVTVS 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 ASENIYSNLA WHQQKQGKSPQLLV YAATNLADGVPSRFSGNGSDTQYS LKINSLQSEDFGSYFC QNFWGTSW 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	EVKLVESGGGLVQPQGGSLKLSCAA SGFTFSSYIM SWVRQTPEKRLEWV ASIVSSNITY YPDSMKG RFTISR D NARNILYLQMSSLKSEDTAMYYCA RGTRAWFAY WGQGTLVTVSA
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 ASKSVSTSAYSY MHWYQQKPGQPP KLLIY LASNLES GVPARFSGSGSG TDFTLNIHPVEEDAATYYC QHSR ELPYT FGGGTKLEIK
106	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de chAb17	RASKSVSTSAYSYMH
107	secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VL de chAb17	QHSRELPYT
108	secuencia de aminoácidos de la VH de chAb5	QVQLQQPGDELVKPGASVKLSCKT SGYFTT TDWMHWVKQRPGQGLEWI GMIHPNSGTTNYNEKF K SKAALT DKSSSTACMQLSSLTSEDSAVYYC AR SYWKWYFDV WGTTVTVSS
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	MIHPNSGTTNYNEKF K SK
111	secuencia de aminoácidos de la CDR3 de la VH de chAb5	SYWKWYFDV
112	secuencia de aminoácidos de la VL de chAb5	QIVLTQSPAIMSASLGEEITLTC S ASSSVSY MHWYQQKSGTSPKLLIY STSNL ASGVPSRFSGSGSGT FY SL TISSVEAEDSADYYC HQWTSY MYT 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 ARYSGSTPYWYFDVWGQGTTVTVS S
117	secuencia de aminoácidos de la VH de huAb18VH.1a, huAb18v3, huAb18v8 y huAb18v9	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYSFTSYTIHWVRQAPGQGLEWI GYINPNSRNTDYNQKFKDRVTITA DRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYSGSTPYWYFDVWGQGTTVTVS S
118	secuencia de aminoácidos de la VH de huAb18VH.1b, huAb18v2, huAb18v4, huAb18v6, huAb18v7 y huAb18v10	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYSFTSYTIHWVRQAPGQGLEWM GYINPNSRNTDYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARYSGSTPYWYFDVWGQGTTVTVS S
119	secuencia de aminoácidos de la CDR2 de la VH de huAb18VH.1b	YINPNSRNTDYAQKFQG
120	secuencia de aminoácidos de la VL de huAb18VL.1, huAb18v1 y huAb18v2	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASSSVSYMNWYQQKPGKAPKLLIY ATSNLASGVPSRFSGSGSGTEFTL TISSLQPEDFATYYC QQWSSNPLT FGQGTKEIK
121	secuencia de aminoácidos de la VH de huAb18VL.1a, huAb18v3 y huAb18v4	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASSSVSYMNWYQQKPGKSPKPWIY ATSNLASGVPSRFSVSGSGTEHTL TISSLQPEDFATYYC QQWSSNPLT FGQGTKEIK
122	secuencia de aminoácidos de la VL de huAb18VL.1b, huAb18v8 y huAb18v10	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASSSVSYMNWYQQKPGKAPKWIY ATSNLASGVPSRFSVSGSGTEHTL TISSLQPEDFATYYC QQWSSNPLT FGQGTKEIK
123	secuencia de aminoácidos de la VL de huAb18VL.2, huAb18v5 y huAb18v6	EIVLTQSPDFQSVPKEKVTITCR ASSSVSYMNWYQQKPDQSPKLLIK ATSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTL TINSLEAEDAATYYC QQWSSNPLT FGQGTKEIK
124	secuencia de aminoácidos de la VL de huAb18VL.2a, huAb18v7 y huAb18v9	EIVLTQSPDFQSVPKEKVTITCR ASSSVSYMNWYQQKPDQSPKPWIY ATSNLASGVPSRFSVSGSGTDFTL TINSLEAEDAATYYC QQWSSNPLT FGQGTKEIK
125	secuencia de aminoácidos de la VH de huAb3VH.1, huAb3v1 y huAb3v4	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWM GLIHPDSGSTNYNEMFKNRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC ARGGRLYFDYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
126	secuencia de aminoácidos de la VH de huAb3VH.1a, huAb3v3 y huAb3v6	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPDSGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYVELSSLRSEDTAVYFC AGGGRLYFDYWGQGTTVTVSS
127	secuencia de aminoácidos de la VH de huAb3VH.1b, huAb3v2 y huAb3v5	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPDSGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AGGGRLYFDYWGQGTTVTVSS
128	secuencia de aminoácidos de la VL de huAb3VL.1, huAb3v1 y huAb3v2	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR SSQSLVHSNGDTYLRWYLQKPGQS PQLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDGVVYYC SQS THVPYT FGGGTKVEIK
129	secuencia de aminoácidos de la VL de huAb3VL.1a y huAb3v3	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR SSQSLVHSNGDTYLRWYLQKPGQS PQLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDGVVYFC SQS THVPYT FGGGTKVEIK
130	secuencia de aminoácidos de la VL de huAb3VL.1b, huAb3v4, huAb3v5 y huAb3v6	DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR SSQSLVHSNGDTYLRWYLQKPGQS PQLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDGVVYYC SQS THVPYT FGGGTKVEIK
131	secuencia de aminoácidos de la VH de huAb3v2.1, huAb3v2.2 y huAb3v2.3	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPWSGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AGGGRLYFDYWGQGTTVTVSS
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	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR SSQSLVHSSSGDTYLRWYLQKPGQS PQLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDGVVYYC SQS THVPYT FGGGTKVEIK
134	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de huAb3v2.1, huAb3v2.4 y huAb3v2.7	RSSQLVHSSGDTYLR
135	secuencia de aminoácidos de la VL de huAb3v2.2, huAb3v2.5 y huAb3v2.8	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR SSQSLVHSNRDTYLRWYLQKPGQS PQLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDGVVYYC SQS THVPYT FGGGTKVEIK
136	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de huAb3v2.2, huAb3v2.5 y huAb3v2.8	RSSQLVHSNRDTYLR
137	secuencia de aminoácidos de la VL de huAb3v2.3, huAb3v2.6 y huAb3v2.9	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR SSQSLVHSNQDTYLRWYLQKPGQS PQLLIY KVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDGVVYYC SQS THVPYT FGGGTKVEIK
138	secuencia de aminoácidos de la CDR1 de la VL de huAb3v2.3, huAb3v2.6 y huAb3v2.9	RSSQLVHSNQDTYLR

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
139	secuencia de aminoácidos de la VH de huAb3v2.4, huAb3v2.5 y huAb3v2.6	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPESGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AGGGRLYFDYWGQGTTVTVSS
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 SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPISGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AGGGRLYFDYWGQGTTVTVSS
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 LTISLQPEDFATYYCQQYNWYPF TEFGQGTKLEIK DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKSPKALI YSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFAEYFCQQYNWYPF TEFGQGTKLEIK DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCK ASQNVGFNVAWYQQKPGKAPKLLI YSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISLQPEDFATYFCQQYNWYPF TEFGQGTKLEIK
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	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAV SGYSITSGYSWHWIRQPPKGLEW IGYIHSSGSTNYNPSLKSRTVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYFEYWGQGTTVTVSS
147	secuencia de aminoácidos de la VH de huAb13VH.1a, huAb13v1, huAb13v5 y huAb13v6	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAV TGYSITSGYSWHWIRQFPGNGLEW MGYIHSSGSTNYNPSLKSRSISR DTSKNQFFLKLSVTAAADTAVYYC AGYDDYFEYWGQGTTVTVSS
148	secuencia de aminoácidos de la VH de huAb13VH.1b, huAb13v7, huAb13v8 y huAb13v9	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAV SGYSITSGYSWHWIRQPPGNGLEW MGYIHSSGSTNYNPSLKSRTISR DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC ARYDDYFEYWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
149	Secuencia de aminoácidos de B7-H3 (humana)	MLRRRGSPGMGVHVGAA LGALWFC LTGALEVQVPEDPVVALVGT DATL CCSF SPEPGFSLAQLNL IWQLTDT KQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALF PDLLA QGNASLRLQRVRADEGSF TCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSK PSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSY QGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTT SQMANEQGLFDVHSILRVVLGANG TYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQ RSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDA TLRCSFSPEPGFSLAQLNL IWQLT DTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTA LFPDLLA QGNASLRLQRVRADEG SFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPY SKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCS SYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNV TTSQMANEQGLFDVHSVL RVVLGA NGTY SCLVRNPVLQQDAHGSVTIT GQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIAL LVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAE DQDGE GE GSKTALQPLKHSDSKED DGQEIA
150	B7-H3-ECD humano (fusión fc) Nota: la secuencia Fc está subrayada	MLRRRGSPGMGVHVGAA LGALWFC LTGALEVQVPEDPVVALVGT DATL CCSF SPEPGFSLAQLNL IWQLTDT KQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALF PDLLA QGNASLRLQRVRADEGSF TCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSK PSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSY QGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTT SQMANEQGLFDVHSILRVVLGANG TYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQ RSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDA TLRCSFSPEPGFSLAQLNL IWQLT DTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTA LFPDLLA QGNASLRLQRVRADEG SFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPY SKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCS SYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNV TTSQMANEQGLFDVHSVL RVVLGA NGTY SCLVRNPVLQQDAHGSVTIT GQPMTFAAAD KTHCPCPAPEAE <u>GAPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEV</u> <u>TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE</u> <u>VHNAKTKPREEQYNNSTYRVVSVLT</u> <u>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP</u> <u>IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR</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 SEDPVVALVDTDATLRCFSPEPG FSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTE GRDQGSAYSNRTALFPDLLVQGNA SLRLQRVRVTDEGSYTCFVSIQDF DSAASLQVAAPYSKPSMTLEPNK DLRPGNMVTITCSSYQGYPEAEVF WKDGQGVPLTGNVTTSQMANERGL FDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNP VLQDAHGSVTITGQPLTFHHHHH H
154	B7-H3-ECD de Cynomolgus (marcado con his)	MLHRRGSPGMGVHVGAAALGALWFC LTGALEVQVPEDPVVALVGTDATL RCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDT KQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALF LDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSF TCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSK PSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSY RGYPEAEVFWQDGQGAPLTGNVTT SQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANG TYSCLVRNPVLQQDAHGSITITPQ RSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDA TLRCSF SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLV HSFTEGRDQGSAYANRTALFLDLL AQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFV SIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMT LEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYP EAEVFWQDGQGAPLTGNVTTSQMA NEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYS LVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTF AAAHHHHHHHH
155	Secuencia de aminoácidos de IGHV1-69*06	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFSYYAISWVRQAPGQGLEWM GGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITA DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AR
156	Secuencia de aminoácidos de IGHJ6*01	WGQGTTTVTSS
157	Secuencia de aminoácidos de IGKV1-9*01	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCR ASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLI YAASLTQSGVPSRFSGSGSGTEFT LTISLQPEDFATYYCQQLNSYPP
158	Secuencia de aminoácidos de IGKJ2*01	FGQGTKLEIK
159	Región constante de Ig gamma-1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHCPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
160	Mutante de la región constante de Ig gamma-1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKENWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVTLLPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPKG
161	Región constante de Ig Kappa	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFRGEC
162	Región constante de Ig Lambda	QPKAAAPSVTLFPPSSEELQANKAT LVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPV KAGVETTPSKQSNNKYAASSYLS LTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS
163	Secuencia de aminoácidos de IGKV6-21*01	EIVLTQSPDFQSVPKEKVTITCR ASQSIGSSLHWYQQKPDQSPKLLI KYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFT LTINSLEAEDAATYYCHQSSSLPX
164	Secuencia de aminoácidos de IGKV2-28*01	DIVMTQSPSLPVTPGEPASISCR SSQSLLHSNGNYLDWYLQKPGQS PQLLIYLGSNRASGVPDFRSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQA LQTPP
165	Secuencia de aminoácidos de IGKJ4*01	FGGGTTKVEIK
166	Secuencia de aminoácidos de IGHV-b*01(0-1)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAV SGYSISSLGGYYWGWIROPPKGLEW IGSIYHSGSTYYNPSLKSRTVTISV DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC AR
167	Secuencia de aminoácidos de IGKv1-39*01	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISISSLQPEDFATYYCQQSYSTPP

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.	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAV TGYSITSGYSWHWIRQFPNGLEW MGYIHSSGSTNYNPSLKSRSIISR DTSKNQFFLKLSSVTAA <u>D</u> TAVYYC AGYDDYF EY WGQGTTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYF PE PTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSVVTVPS <u>SS</u> GTQTYICNVN <u>H</u> KPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPCPAPEAAGGPSV LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV <u>D</u> VS <u>H</u> EDPEVKFNWYV D GVEVHN <u>A</u> KT KPREEQYNSTYR <u>V</u> VSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSN <u>K</u> ALPAPIEKTIS KAKGQP RE PQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDI <u>A</u> VEWESNG QPENNYKTTPPV <u>L</u> SDGSFFLYSK LTV <u>D</u> KSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQ <u>K</u> SLSLSPGK
169	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de huAb13v1 Nota: la secuencia de la región constante de Ig kappa está subrayada.	DIQMTQSP <u>S</u> SSLSASVGDRVTITCK ASQN <u>V</u> GFnVAWYQQKPGKSPKALI YSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDF <u>T</u> LT <u>I</u> SSLQPEDFAEYFCQQYNNWYPF T F GQGT <u>K</u> LEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLNNFYPREA KVQW <u>K</u> VDN <u>A</u> QSGNSQESVTEQDS KDSTYS <u>L</u> SS <u>T</u> TL <u>S</u> KADY <u>E</u> HKVY ACEVTHQ <u>G</u> LS <u>S</u> PVTKSFNR <u>G</u> EC
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 SGYTFSSYWMHWV <u>R</u> QAPGQGLEWI GLIHP <u>E</u> SGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAY <u>M</u> ELSSLRSE <u>D</u> TAVYYC AGGG <u>R</u> LYFDYWGQGTTV <u>S</u> AST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG <u>C</u> LVKDYF PE PTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSVVTVPS <u>SS</u> LGTQTYICNVN <u>H</u> KPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV <u>D</u> DVS <u>H</u> EDPEVKFNWYV D GVEVHN <u>A</u> KT TKPREEQYNSTYR <u>V</u> VSVLTVLHQDW WLN <u>G</u> KEYKCKVSN <u>K</u> ALPAPIEKT <u>I</u> SKAKGQP RE PQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDI <u>A</u> VEWESN GQPENNYKTTPPV <u>L</u> SDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQ <u>K</u> SLSLSPGK
171	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de huAb3v2.5 Nota: la secuencia de la región constante de Ig kappa está subrayada.	DIVMTQSP <u>L</u> SPVTPGEPASISCR SSQSLVHSNRDT <u>L</u> RWY <u>L</u> QKPGQS PQLLIYKVS <u>N</u> RFSGV <u>P</u> DRFSGSGS GTDFTL <u>K</u> ISRVE <u>A</u> EDVGVYYCSQS THV <u>P</u> YTFGGGT <u>K</u> VEIKRTVAAPSV FIFPPS <u>D</u> EQ <u>L</u> KSGTASVVCLNNF Y <u>P</u> REAKV <u>Q</u> W <u>K</u> VDNA <u>L</u> QSGNSQESV TEQ <u>D</u> SKDSTYS <u>L</u> SL <u>T</u> LS <u>K</u> ADY <u>E</u> HKH <u>V</u> YACEVTHQ <u>G</u> LS <u>S</u> PVTKSFNR 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.	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPESGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAGGGRLYFD YWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAA <u>L</u> KGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEAAGGSPVFLFPPPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAA <u>K</u> TKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVS <u>L</u> TCLV 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.	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR SSQSLVHSNQDTYLRWY <u>L</u> QKPGQS PQLLIYKVS <u>N</u> RFSGV <u>D</u> RFSGSGS GTDFTLKISRVEA <u>E</u> DVGVYYCSQS THV <u>P</u> YTFGGGT <u>K</u> VEIK <u>R</u> TVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASV <u>V</u> CLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTY <u>S</u> LSST <u>L</u> TSKADYE KHKVYACEVTH <u>Q</u> GLSSPVT <u>K</u> SFNR GEC
174	Secuencia de aminoácidos de IGHV1-69*06_IGHJ6	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKA SGGTFS <u>Y</u> AI <u>S</u> WVRQAPGQGLEWM GGIIP <u>I</u> FGTANYA <u>Q</u> KFQGRVTITA DKSTSTAYM <u>E</u> LSSLRSEDTAVYYC ARXXXXXXXXW <u>G</u> QGTTVTVSS
175	Secuencia de aminoácidos de IGKV2-28*01_IGKJ4	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR SSQSL <u>H</u> NSGNYNYLDWY <u>L</u> QKPGQS PQLLIY <u>L</u> GSNRASGV <u>D</u> RFSGSGS GTDFTLKISRVEA <u>E</u> DVGVYYCXXX XXXXXX <u>F</u> GGGT <u>K</u> VEIK
176	Secuencia de aminoácidos de IGHV4-b_IGHJ6	QVQLQESGPGLVKPSET <u>L</u> TCAV SGYS <u>I</u> SSG <u>Y</u> YWGWI <u>R</u> QPPGKGLEW IGSIYH <u>S</u> G <u>ST</u> YYN <u>PSL</u> KSRVTISV DTS <u>KNQ</u> FS <u>L</u> KLSSVTAADTAVYYC ARXXXXXXXXW <u>G</u> QGTTVTVSS
177	Secuencia de aminoácidos de IGKV1-39_IGKJ2	DIQMTQS <u>P</u> SS <u>L</u> SASVGDRVTITCR ASQ <u>S</u> ISS <u>Y</u> LNW <u>Y</u> QQKPGKAP <u>K</u> LLI YAASS <u>L</u> QSGV <u>P</u> SR <u>F</u> SG <u>G</u> SG <u>T</u> DFT LT <u>I</u> SS <u>L</u> Q <u>P</u> ED <u>F</u> ATYYCXXXXXX X <u>F</u> G <u>Q</u> GT <u>K</u> LEIK
178	Secuencia de aminoácidos de las variantes de huAb3 VL1 Nota: X puede ser cualquier aminoácido excepto: M, C, N, D o Q	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR SSQSLVHS <u>X</u> G <u>D</u> TYL <u>R</u> WY <u>L</u> QKPGQS PQLLIYKVS <u>N</u> R <u>F</u> SGV <u>D</u> RFSGSGS GTDFTLKISRVEA <u>E</u> DVGVYYCSQS THV <u>P</u> YTFGGT <u>K</u> VEIK

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	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCR SSQSLVHSNXDTYLRWYLQKPGQS PQLLIYKVSNRFSFGVPDRFSGSGS 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	EVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPXSGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AGGGRLYFDYWGQGTTVTVSS
181	Secuencia de aminoácidos de las variantes de huAb3 VH1b Nota: X puede ser cualquier aminoácido excepto: M, C, G, S, N o P	EVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKA SGYTFSSYWMHWVRQAPGQGLEWI GLIHPDXGSTNYNEMFKNRATLTV DRSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC AGGGRLYFDYWGQGTTVTVSS
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

50

55

60

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

ES 2 861 499 T3

5 <210> 5
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb2
 <400> 5

15	Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
	1 5 10 15
20	Asp Gln Ala Tyr Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ile
	20 25 30
25	Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ser
	35 40 45
30	Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
	50 55 60
35	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
	65 70 75 80
40	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
	85 90 95
45	Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
	100 105 110
50	<210> 6 <211> 16 <212> PRT <213> Secuencia Artificial
55	<220> <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb2
60	<400> 6
65	Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ile Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His 1 5 10 15
70	<210> 7 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia Artificial
75	<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
80	<400> 7
85	Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser 1 5
90	<210> 8 <211> 9 <212> PRT

ES 2 861 499 T3

<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

222

20 <220>
<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

<210> 15

<211> P12

<212> PRI
<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		

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> 11

<211> 15

<213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb3, huAb3VL.1, huAb3VL.1a, y
 huAb3VL.1b

10 <400> 14

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asp	Thr	Tyr	Leu	Arg
1				5					10				15		

15 <210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <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

25 <400> 15

Ser	Gln	Ser	Thr	His	Val	Pro	Tyr	Thr
1				5				

30 <210> 16

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb4

40 <400> 16

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			

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															

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			

65

Leu	Thr	Val	Ser	Ser
				115

<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
1 540 <210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial45 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb4

50 <400> 20

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 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

50 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala
 1 5 10

55 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de chAb4

65 <400> 22

50 Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
 1 5

55 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb4

65 Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

65 <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

65 Lys Asp Glu Thr Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
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

<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

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

<210> 26

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sinté

60 <400> 26

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

65 Asp

ES 2 861 499 T3

5 <210> 27
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de chAb18, huAb18VH.1, huAb18VH.1a, y huAb18VH.1b VH CDR3
 <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										15

25 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb18

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

30 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb18

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

35 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb18

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

40 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb18

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

45 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb18

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

50 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb18

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

55 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <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

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

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

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <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		

10

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb18, huAb18VL.1, huAb18VL.1a, huAb18VL.1b, huAb18VL.2, y huAb18VL.2a

20 <400> 31

Gln	Gln	Trp	Ser	Ser	Asn	Pro	Leu	Thr
1					5			

25 <210> 32

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

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

<400> 32

35 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Ser Gln

1		5		10		15	
---	--	---	--	----	--	----	--

40

Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	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	Lys	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

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

60

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

65

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

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <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

<400> 33

Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Trp	His
1				5					10	

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <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

<400> 34

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

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <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

<400> 35

Tyr	Asp	Asp	Tyr	Phe	Glu	Tyr
1				5		

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <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

15 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser 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 Val Gln Ser
 65 70 75 80

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

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

35 <210> 37
 <211> 11
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb13, huAb13VL.1, huAb13VL.1a, huAb13VL.1b, huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8, y huAb13v9

50 <400> 37

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

60 <210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia Artificial

70 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de chAb13, huAb13VL.1, huAb13VL.1a, huAb13VL.1b, huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8, y huAb13v9

75 <400> 38

80 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser
 55 1 5

85 <210> 39
 <211> 9
 <212> PRT
 90 <213> Secuencia Artificial

95 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de huAb13VL.1, huAb13VL.1a, huAb13VL.1b, huAb13v1, huAb13v2, huAb13v3, huAb13v4, huAb13v5, huAb13v6, huAb13v7, huAb13v8 y huAb13v9

100 <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

60 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb12
<400> 41

65 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser
1 5 10

70 <210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

75 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb12
<400> 42

ES 2 861 499 T3

1 Thr Ile Ser Ser Gly Thr Asn Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 5
 10 Gly
 15 <210> 43
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb12
 <400> 43
 25 Gln Gly Arg Tyr Ser Trp Ile Ala Tyr
 1 5
 30 <210> 44
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb12
 <400> 44
 40 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 45 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
 20 25 30
 50 Asp Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 55 Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 60 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 65 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95
 70 Glu Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110
 75 <210> 45
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 80 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb12
 <400> 45
 85 Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Asp Tyr Ser Tyr Met His
 90 95 100
 90

<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

15 <210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb14
 20 <400> 50

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

25 Gly

30 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb14
 <400> 51

40 His Tyr Gly Ser Gln Thr Met Asp Tyr
 1 5

45 <210> 52
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <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

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

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

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

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

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

35 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb14

40 <400> 53

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

45 <210> 54
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de chAb14

<400> 54

55 Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp
 1 5

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

60 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb14

<400> 55

Gln His Phe Trp Ser Ile Met Trp Thr
 1 5

65 <210> 56

ES 2 861 499 T3

<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

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

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

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

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

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

40 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

55 <213> Secuencia Artificial

<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

ES 2 861 499 T3

5 <210> 59

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb6

<400> 59

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

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				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

55 <220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb6

<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>

ES 2 861 499 T3

	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly			
1	5	10	15	
5	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser			
	20	25	30	
10	Gly Thr Gln Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln			
	35	40	45	
15	Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val			
	50	55	60	
20	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
	65	70	75	80
25	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Asn			
	85	90	95	
30	Asp Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu			
	100	105	110	
	Lys			
35	<210> 69 <211> 17 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220> <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb11			
	<400> 69			
40	Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Thr Gln Lys Asn Phe Leu			
	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			

Gln Asn Asp Tyr Ile Tyr Pro Leu Thr
 1 5

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

10 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb16

<400> 72

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

20 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

25 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

30 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

35 Ala Arg Pro Gly Phe Gly Asn Tyr Ile Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

40 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 73
 <211> 10
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb16

50 <400> 73

Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp Met Ser
 1 5 10

55 <210> 74
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

60 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb16

<400> 74

65

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
 10 <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
 20 1 5 10

<210> 76
 <211> 107
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial

<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
 40 35 40 45

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

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

<210> 77
 <211> 11
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

<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 Tyr Thr Ser Arg Leu Tyr Leu
 1 5

<210> 79
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb16
 <400> 79

25 Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr
 1 5

<210> 80
 30 <211> 125
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 35 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb10
 <400> 80

40 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly 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 Asp
 20 25 30

45 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Arg Leu Glu Trp
 35 40 45

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

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

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

60 Ala Arg Arg Ser Leu Phe Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Tyr Ala Met
 100 105 110

65 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

5 <210> 81
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <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 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

45 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb10

<400> 86

50 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
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

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

35 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

40 <210> 88
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb7

50 <400> 88

55 Gly Phe Ser Phe Arg Gly Tyr Gly Met Ser
 1 5 10

60 <210> 89
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de chAb7

<400> 89

55 Ala Ile Ser Thr Gly Gly Asn Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Gln
 1 5 10 15

60 Gly

65 <210> 90
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VH de chAb7

ES 2 861 499 T3

<400> 90

Arg	Gly	Gly	Asn	Tyr	Ala	Gly	Phe	Ala	Tyr
1				5					10

5

<210> 91

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb7

<400> 91

15

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

20

Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Pro	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Asn
				20				25				30			

25

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

30

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			

35

Glu	Asp	Phe	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Gly	Thr	Pro	Phe
				85				90			95				

40

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

45

<210> 92

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

50

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb7

<400> 92

55

Arg	Pro	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Asn	Leu	Ala
1					5				10	

60

<210> 93

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65

<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		

65

<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	

30

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

35

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

40

Ala	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Asn	Tyr	Thr	Tyr	Cys	Pro	Asp	Ser	Val
						50		55			60			

45

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

50

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

<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

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

20 Gln Arg Gly Tyr Asp Tyr His Tyr Ala Met Asp Phe
 25 1 5 10

<210> 98
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb8

30 <400> 98

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

45 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 50 20 25 30

55 Leu Ala Trp His Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 60 35 40 45

65 Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 70 50 55 60

75 Asn Gly Ser Asp Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
 80 65 70 75 80

85 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Phe Cys Gln Asn Phe Trp Gly Thr Ser Trp
 90 85 90 95

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

<210> 99
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de chAb8

<400> 99

65 Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
 70 1 5 10

ES 2 861 499 T3

5 <210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb8

15 <400> 100

10 Gln Asn Phe Trp Gly Thr Ser Trp Thr
1 5

20 <210> 101

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de chAb17

<400> 101

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

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

35 Ile Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

40 Ala Ser Ile Val Ser Ser Asn Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met Lys
50 55 60

45 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
65 70 75 80

50 Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

60 Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 102

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de chAb17

<400> 102

65 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ile Met Ser
1 5 10

70 <210> 103

<211> 16

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

<210> 112
 <211> 106
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de chAb5

40 <400> 112

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

45 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 Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 113
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <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

Ser	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser
1				5		

25 <210> 115
 30 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb5
 <400> 115

His	Gln	Trp	Thr	Ser	Tyr	Met	Tyr	Thr
1				5				

40 <210> 116
 <211> 121
 <212> PRT
 45 <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

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

20 Lys Asp 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 Tyr Ser Gly Ser Thr Pro Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

35 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

40 <210> 117
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb18VH.1a, huAb18v3, huAb18v8, y huAb18v9
 <400> 117

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

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

60 Thr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

75 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

85 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			

25

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

30

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Leu	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			

40

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

45

Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser							
			115			120									

50

<210> 119
 <211> 17
 <212> PRT

55

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de huAb18VH.1b

50

<400> 119
 <210> 119
 <211> 17
 <212> PRT

60

<213> Secuencia Artificial

65

<220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb18VL.1, huAb18v1, y huAb18v2
 <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

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

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

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

30 <210> 121
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb18VL.1a, huAb18v3, y huAb18v4

40 <400> 121

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

45 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Val Ser Gly Thr Glu His Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 65 70 75 80

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

60 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

65 <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

10 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

15 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala 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

25 Gly Ser Gly Thr Glu His Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
65 70 75 80

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

35 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

50 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys
35 40 45

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

60 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

70 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

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

25 Val Ser Gly Thr Asp His Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu
65 70 75 80

30 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

35 <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

40 <210> 126
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb3VH.1a, huAb3v3, y huAb3v6
 <400> 126

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

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

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

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

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

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

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

85 Val Thr Val Ser Ser
 115

ES 2 861 499 T3

<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

25

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

30

Lys Asn Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg 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

40

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> 128

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3VL.1, huAb3v1, y huAb3v2

<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	
10	Asn Gly 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 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 Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	110	
35	<210> 129			
	<211> 112			
	<212> PRT			
	<213> Secuencia Artificial			
40	<220>			
	<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3VL.1a y huAb3v3			
45	<400> 129			
50	Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly			
	1	5	10	15
55	Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser			
	20	25	30	
60	Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
	35	40	45	
65	Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
	50	55	60	
70	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile			
	65	70	75	80
75	Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser			
	85	90	95	
80	Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	110	
85	<210> 130			
	<211> 112			
	<212> PRT			
	<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 Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 131

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35 <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

ES 2 861 499 T3

5 <210> 132
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de huAb3v2.1, huAb3v2.2, y huAb3v2.3
 <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
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3v2.1, huAb3v2.4, y huAb3v2.7
 <400> 133

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

25 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3v2.1, huAb3v2.4, y huAb3v2.7
 <400> 133

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

30 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3v2.1, huAb3v2.4, y huAb3v2.7
 <400> 133

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

35 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3v2.1, huAb3v2.4, y huAb3v2.7
 <400> 133

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

40 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3v2.1, huAb3v2.4, y huAb3v2.7
 <400> 133

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

45 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3v2.1, huAb3v2.4, y huAb3v2.7
 <400> 133

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

50 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb3v2.1, huAb3v2.4, y huAb3v2.7
 <400> 133

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

55 <210> 134
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 60 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de huAb3v2.1, huAb3v2.4, y huAb3v2.7
 <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

15 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 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 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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe 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

50 <210> 137
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <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

35 <210> 138
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de huAb3v2.3, huAb3v2.6, y huAb3v2.9

45 <400> 138

40 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gln Asp Thr Tyr Leu Arg
1 5 10 15

45 <210> 139
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb3v2.4, huAb3v2.5, y huAb3v2.6

55 <400> 139

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

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

30 Val Thr Val Ser Ser
 115

35 <210> 140
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de huAb3v2.4, huAb3v2.5, y huAb3v2.6
 <400> 140

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

Asn

50 <210> 141
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VH de huAb3v2.7, huAb3v2.8, y huAb3v2.9
 <400> 141

60

ES 2 861 499 T3

5	Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	1	5	10	15
10	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr	20	25	30	
15	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	35	40	45	
20	Gly Leu Ile His Pro Ile 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	
35	Ala Gly Gly Arg Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr	100	105	110	
40	Val Thr Val Ser Ser	115			
45	<210> 143				
50	<211> 17				
55	<212> PRT				
60	<213> Secuencia Artificial				
65	<220>				
70	<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de huAb3v2.7, huAb3v2.8, y huAb3v2.9				
75	<400> 142				
80	Leu Ile His Pro Ile Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe Lys	1	5	10	15
85	Asn				
90	<210> 143				
95	<211> 107				
100	<212> PRT				
105	<213> Secuencia Artificial				
110	<220>				
115	<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb13VL.1, huAb13v2, huAb13v5, y huAb13v7				
120	<400> 143				

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 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

25 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Trp Tyr Pro Phe
 85 90 95

30 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

35 <210> 144
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Sintética: secuencia de aminoácidos de VL de huAb13VL.1a, huAb13v1, huAb13v3, y huAb13v8
 <400> 144

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

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

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

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

65 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

70 Glu Asp Phe Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Trp Tyr Pro Phe
 85 90 95

75 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

80 <210> 145
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

85 <220>

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
10	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Phe Asn 20 25 30 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
25	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Trp Tyr Pro Phe 85 90 95
30	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105
35	<210> 146 <211> 116 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <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
45	Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly 20 25 30
50	Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp 35 40 45 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
60	Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95
65	Ala Arg Tyr Asp Asp Tyr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val 100 105 110
	Thr Val Ser Ser 115

ES 2 861 499 T3

<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

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

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

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

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

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

20 Thr Val Ser Ser
115

25 <210> 149
<211> 534
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <220>
<221> misc_característica
<222> (1)..(534)
<223> Secuencia de aminoácidos de la B7-H3 (humana)

35 Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1 5 10 15

40 Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30

45 Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45

50 Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
50 55 60

55 Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
65 70 75 80

60 Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
85 90 95

65 Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
100 105 110

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	
	Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr			
	275	280	285	
40	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
	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				
65				

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	Ser	Lys	Thr	Ala	Leu	Gln	Pro	Leu	Lys	His	Ser	Asp	Ser	Lys	Glu	Asp
						515				520				525		
45	Asp	Gly	Gln	Glu	Ile	Ala										
					530											
50	<210>	150														
	<211>	692														
	<212>	PRT														
	<213>	Homo sapiens														
55	<220>															
	<221>	misc_característica														
	<222>	(1)..(692)														
60	<223>	B7-H3-ECD humana (fusión a fc)														
	<400>	150														
65	Met	Leu	Arg	Arg	Arg	Gly	Ser	Pro	Gly	Met	Gly	Val	His	Val	Gly	Ala
	1					5						10				15
	Ala	Leu	Gly	Ala	Leu	Trp	Phe	Cys	Leu	Thr	Gly	Ala	Leu	Glu	Val	Gln

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

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 Ile 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			
	370	375	380	
25	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
	Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr 65	70	75
15	Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Arg Thr Ala Leu Phe 85	90	95
20	Pro Asp Leu Leu Val Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val 100	105	110
	Arg Val Thr Asp Glu Gly Ser Tyr Thr Cys Phe Val Ser Ile Gln Asp 115	120	125
25	Phe Asp Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys 130	135	140
30	Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asn Met 145	150	155
	160		
35	Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val 165	170	175
	180	185	190
40	Ser Gln Met Ala Asn Glu Arg Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu 195	200	205
	210	215	220
45	Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn 225	230	235
	240		
50	Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln 245	250	255
	260	265	270
55	Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro 60		
	65		

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

15 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 325 330 335

20 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 340 345 350

25 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 355 360 365

30 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 370 375 380

35 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 385 390 395 400

40 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 405 410 415

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

50 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 435 440 445

55 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460

60 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

65 <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

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		
10	Ala	Leu	Val	Gly	Thr	Asp	Ala	Thr	Leu	Cys	Cys	Ser	Phe	Ser	Pro	Glu
					35				40				45			
15	Pro	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala	Gln	Leu	Asn	Leu	Ile	Trp	Gln	Leu	Thr	Asp
					50				55			60				
20	Thr	Lys	Gln	Leu	Val	His	Ser	Phe	Ala	Glu	Gly	Gln	Asp	Gln	Gly	Ser
					65			70		75			80			
25	Ala	Tyr	Ala	Asn	Arg	Thr	Ala	Leu	Phe	Pro	Asp	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly
					85				90				95			
30	Asn	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Gln	Arg	Val	Arg	Val	Ala	Asp	Glu	Gly	Ser
					100				105			110				
35	Phe	Thr	Cys	Phe	Val	Ser	Ile	Arg	Asp	Phe	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ser
					115			120			125					
40	Leu	Gln	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ser	Lys	Pro	Ser	Met	Thr	Leu	Glu	Pro
					130			135			140					
45	Asn	Lys	Asp	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ser
					145			150			155			160		
50	Tyr	Gln	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ala	Glu	Val	Phe	Trp	Gln	Asp	Gly	Gln	Gly
					165				170			175				
55	Val	Pro	Leu	Thr	Gly	Asn	Val	Thr	Thr	Ser	Gln	Met	Ala	Asn	Glu	Gln
					180			185			190					
60	Gly	Leu	Phe	Asp	Val	His	Ser	Ile	Leu	Arg	Val	Val	Leu	Gly	Ala	Asn
					195			200			205					
65	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Leu	Val	Arg	Asn	Pro	Val	Leu	Gln	Gln	Asp	Ala
					210			215			220					
	His	Ser	Ser	Val	Thr	Ile	Thr	Pro	Gln	Arg	Ser	Pro	Thr	Gly	Ala	Val
					225			230		235			240			
	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
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
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 His 450	455	460

ES 2 861 499 T3

5 <210> 153
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 10 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (1)..(241)
 <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 25 30
20	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
30	Gln Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr 65 70 75 80
	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
45	Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys 130 135 140
	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
55	Leu Thr Gly Asn Val Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Arg Gly Leu 180 185 190
60	Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr 195 200 205
	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

Met	Leu	His	Arg	Arg	Gly	Ser	Pro	Gly	Met	Gly	Val	His	Val	Gly	Ala
1									10						15

Ala	Leu	Gly	Ala	Leu	Trp	Phe	Cys	Leu	Thr	Gly	Ala	Leu	Glu	Val	Gln
								20					25		30

Val	Pro	Glu	Asp	Pro	Val	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Thr	Asp	Ala	Thr	Leu
							35				40		45		

25

Arg	Cys	Ser	Phe	Ser	Pro	Glu	Pro	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala	Gln	Leu	Asn
							50			55		60			

30

Leu	Ile	Trp	Gln	Leu	Thr	Asp	Thr	Lys	Gln	Leu	Val	His	Ser	Phe	Thr
						65			70			75		80	

35

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

40

Leu	Asp	Leu	Leu	Ala	Gln	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Gln	Arg	Val
						100				105		110			

Arg	Val	Ala	Asp	Glu	Gly	Ser	Phe	Thr	Cys	Phe	Val	Ser	Ile	Arg	Asp
						115			120			125			

45

Phe	Gly	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Leu	Gln	Val	Ala	Ala	Pro	Tyr	Ser	Lys
						130			135			140			

50

Pro	Ser	Met	Thr	Leu	Glu	Pro	Asn	Lys	Asp	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Thr
						145			150			155		160	

60

Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ala	Glu	Val
						165			170			175			

65

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

Gly Ala 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
 420 425 430

Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp
 435 440 445

Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Ala Ala
 450 455 460

Ala 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

35 Ala Arg

<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

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 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
25 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de IGKJ2*01

30 <400> 158

35 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

40 <210> 159
<211> 330
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética: región constante de Ig gamma-1

45 <400> 159

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

55

60

65

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

15 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

20 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

25 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

30 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

35 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

40 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

45 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

50 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

55 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

60 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

65 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

70 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

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
 305 310 315 320

15 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

20 <210> 160
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Sintética: mutante de la región constante de Ig gamma-1

30 <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

35 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

50 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

55 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

60

65

ES 2 861 499 T3

	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145																160
5	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
															175	
10																
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
															190	
15																
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
															205	
20																
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
															220	
25																
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
															240	
30																
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
															255	
35																
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
															270	
40																
	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
															285	
45																
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
															300	
50																
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
															320	
55																
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
															330	
60																
65																

<210> 161
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<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

20 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

25 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

30 <210> 162
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 30 <223> Sintética: región constante de Ig Lambda
 <400> 162

40 Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 1 5 10 15

45 Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
 20 25 30

50 Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
 35 40 45

55 Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
 50 55 60

60 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
 65 70 75 80

65 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)

5 <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

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

15 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

20 Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

65 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Xaa
 85 90 95

30 <210> 164
<211> 101
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de |GKV2-28*01|

<400> 164

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

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

50 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala

60 Leu Gln Thr Pro Pro

65 <210> 165
<211> 10
<212> RPT

<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 <210> 168
<211> 446
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de huAb13v1

35 <400> 168

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

20 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

25 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

30 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

35 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

40 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

45 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

50 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

55 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

60

65

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
 <220>
 <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de huAb13v1
 <400> 169
 45 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 50 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 55 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 60
 65

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

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

20 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

25 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

30 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

35 <210> 170
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de huAb3v2.5

<400> 170

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

50 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

55 Gly Leu Ile His Pro Glu 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

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	
	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser			
	290	295	300	
	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

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400

20 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

25 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

30 <210> 171
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de huAb3v2.5

<400> 171

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 Val His Ser
 20 25 30

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

50 Pro Gln 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

60 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
	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
20	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser 165	170	175
25	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu 180	185	190
	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> 172 <211> 447 <212> PRT <213> Secuencia Artificial		
40	<220> <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de huAb3v2.6		
	<400> 172		
45	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		
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 Glu 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		

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
	Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
	130 135 140
15	Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
	145 150 155 160
20	Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
	165 170 175
25	Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
	180 185 190
	Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
	195 200 205
30	Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
	210 215 220
35	Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
	225 230 235 240
	Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
	245 250 255
40	Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
	260 265 270
45	Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
	275 280 285
50	Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
	290 295 300
	Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
	305 310 315 320
55	Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
60	
65	

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
	Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
	405	410	415
25	Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
	420	425	430
30	His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	435	440	445
35	<210> 173 <211> 219 <212> PRT <213> Secuencia Artificial		
40	<220> <223> Sintética: Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de huAb3v2.6		
	<400> 173		
	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	Asn Gln 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
55	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
	65	70	75
	80		
60	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
145 150 155 160

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>
<223> Sintética: IGHV1-69*06_IGHJ6

45 <220>
<221> misc_característica
<222> (99)..(106)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural; esta sección representa la región CDR-H3
<400> 174

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

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

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

60

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

20 Val Thr Val Ser Ser
 115

25 <210> 175
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Sintética: IGKV2-28*01_IGKJ4

35 <220>
 <221> misc_característica
 <222> (94)..(102)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural; esta sección representa la región CDR-L3
 <400> 175

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 Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

70 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

75 <210> 176
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

80 <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

15 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

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

30 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

35 Ala Arg 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

Xaa Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

30 <210> 178
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

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

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

60 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95

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

ES 2 861 499 T3

<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

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

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

40 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
85 90 95

45 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe 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

1 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

60

65

ES 2 861 499 T3

1 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 Asp Xaa 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> 182
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<223> Sintética: secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de chAb13

50 <400> 182

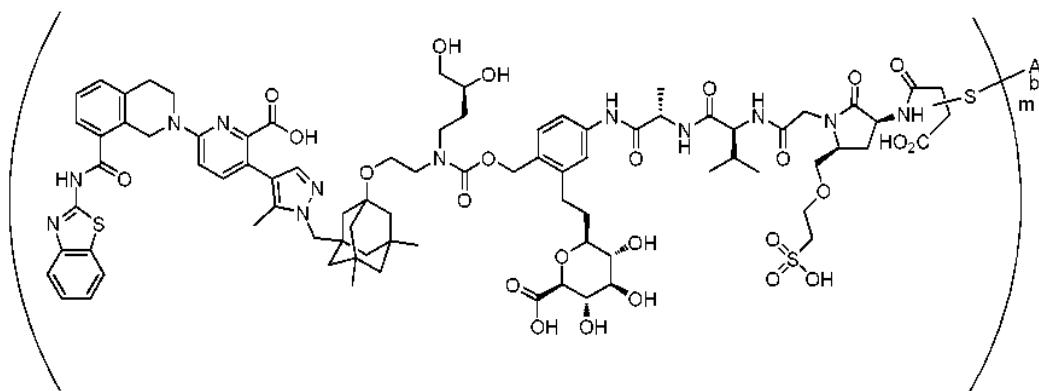
55 Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Phe Thr
1 5

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado anticuerpo anti-B7H3 humano (hB7-H3)-fármaco (ADC) que comprende la siguiente estructura:



20 en donde m es 2 y Ab es un anticuerpo anti-hB7-H3, en donde el anticuerpo Ab comprende
25 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
30 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.

35 2. Un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una
36 región variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 147 y una región variable de la cadena ligera
37 que comprende la SEQ ID NO: 144.

38 3. Un conjugado anticuerpo-fármaco de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una
39 cadena pesada que comprende la SEQ ID NO: 168 y una cadena ligera que comprende la SEQ ID NO: 169.

Figura 1

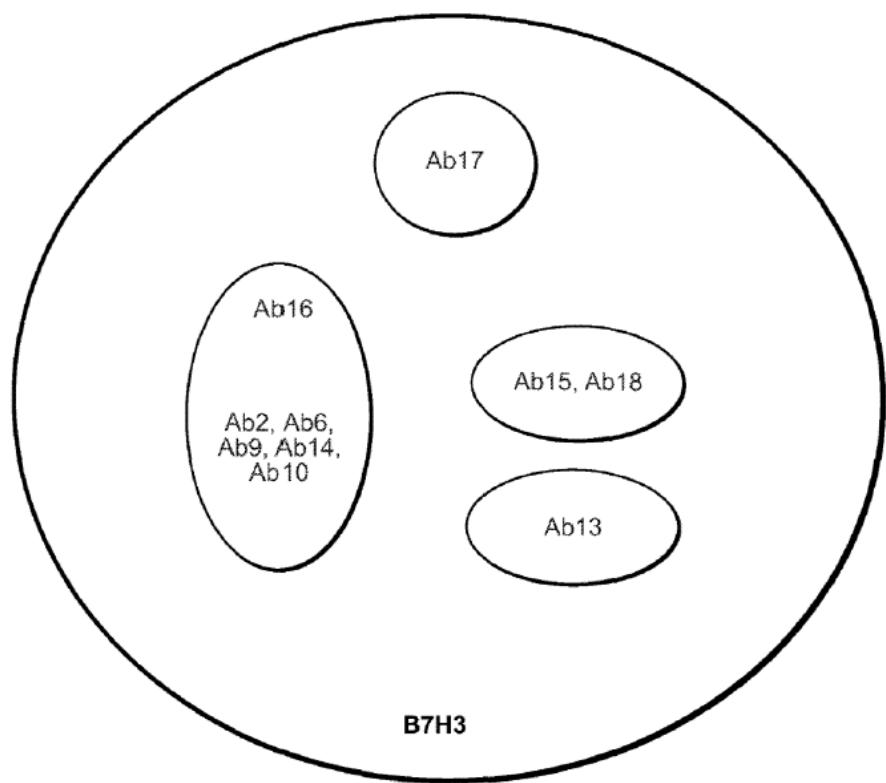
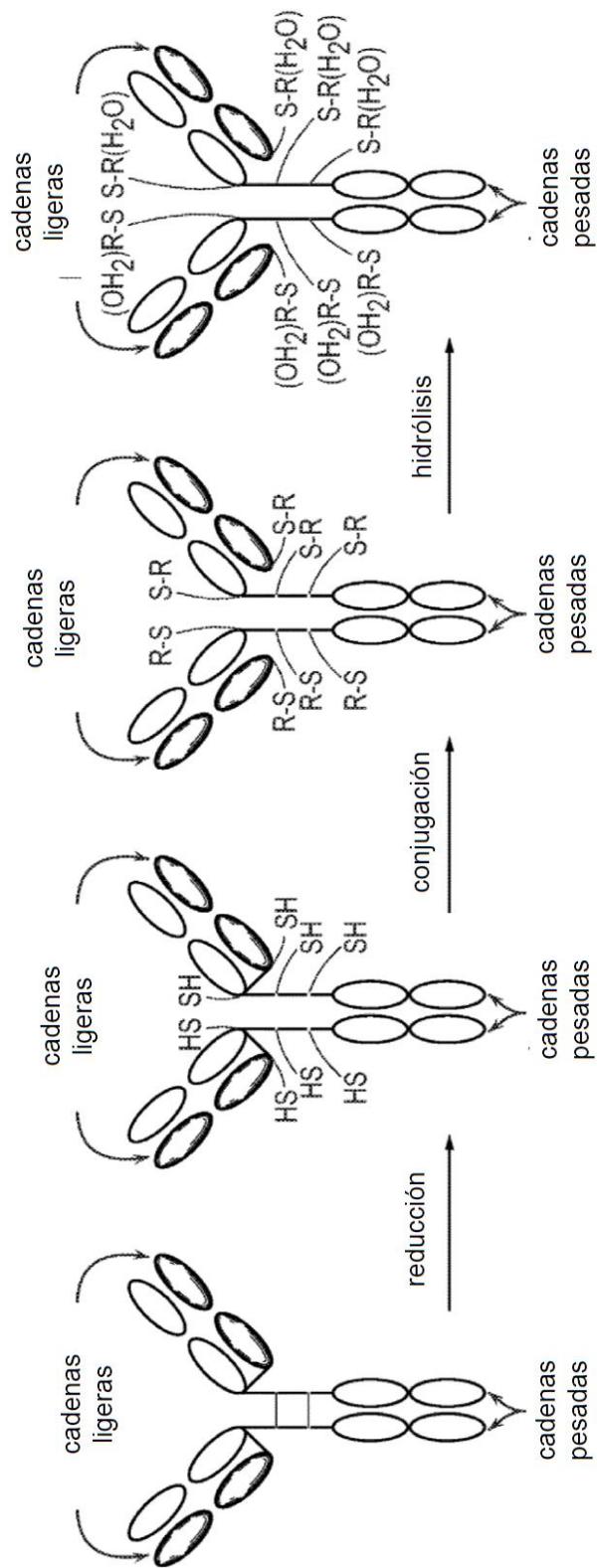


Figura 2



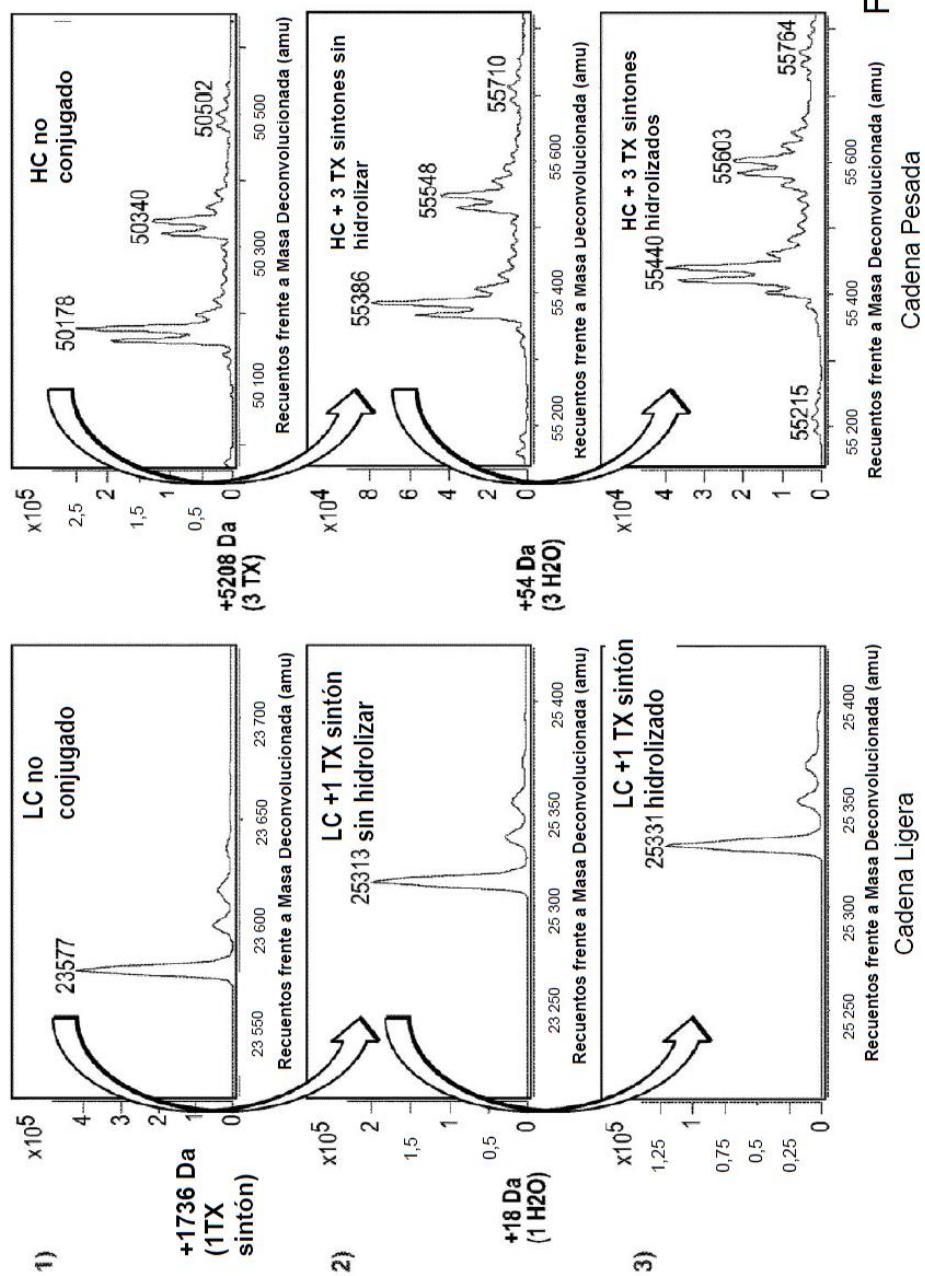


Figura 5