



No. 09-135216- -00010-0000

Fecha: 2013-05-14 17:03:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 2



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



No. 13-119040- -00000-0000

Fecha: 2013-05-14 17:03:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 2

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 09-135.216A

54. TÍTULO "ANTICUERPOS ANTI-CD44
QUIMÉRICOS Y HUMANIZADOS QUE MEDIAN
LA CITOTOXICIDAD DE CÉLULAS DE
CÁNCER".

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 16/30

71. SOLICITANTE F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

DOMICILIO BASILEA, SUIZA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. _____



No. 09-135216- -00010-0000

Fecha: 2013-05-14 17:03:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 2



No. 13-119040- -00000-0000

Fecha: 2013-05-14 17:03:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 2

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión

- ☒ Patente de Invención
☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial
☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitantePersona Natural ☐Persona Jurídica ☒**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**

Nombre o denominación / Nombre o razón social

ALICIA LLOREDA RICAURTE

Nombre del representante legal

Tipo de empresa

Micro ☐Pequeña ☐Mediana ☐Otra ☒

39.690.713 de Usaquén

Documento de identificación:

C.C. ☒C.E. ☐NIT ☐Otro ☐

Número

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Suiza	Grenzacherstrasse 124, CH-4070, Basilea, Suiza	Basilea
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
notificacionespatentes@lloedacamacho.com	6069701	3264270

☒ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:**ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Apellidos y Nombre

39.690.713 de Usaquén

documento de identificación

53.215

Tarjeta profesional

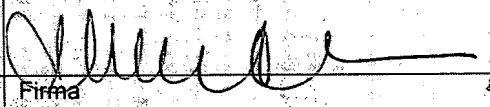
Dirección y domicilio	Ciudad	
Calle 72 No 5-83 piso 5to	Bogotá	
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
notificacionespatentes@lloedacamacho.com	6069701	3264270

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general _____

4. Datos del trámite		
CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____	Expediente _____ <u>09-135.216</u> De: <u>09-135.216</u> A: <u>09-135.216A</u>	Expediente _____ _____ _____ De: _____ A: _____

5. Comprobante de Pago No <u>13-0035189</u>	Fecha <u>15/04/13</u>
---	-----------------------

6. Anexos
☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
☐ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
ALICIA LLOREDA RICAURTE	
Nombre y apellidos	Firma
39.690.713 de Usaquén	53.215
C.C	Tarjeta Profesional

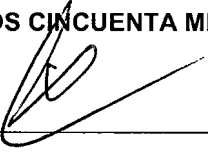
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0035189
		Bogotá D.C., Abril 15 de 2013 - 16:49:09

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.				NI 830.022.145	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	561170201	15/04/2013	15.484.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	450.000.00	450.000.00
			\$450.000.00
=====			

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 
*****_
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6

No. 13-119040- -00000-0000
Fecha: 2013-05-14 17:03:50 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 09-135216- -00010-0000
Fecha: 2013-05-14 17:03:49 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 2

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> YOUNG, DAVID S. F.
FINDLAY, HELEN P.
HAHN, SUSAN E.
CECHETTO, LISA M.
MCCONKEY, FORTUNATA

<120> MEDIACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE CÉLULAS QUE EVIDENCIAN EXPRESIÓN SUPERFICIAL DE CD44

10 <130> 2056.091

<140> 11/807,887
<141> 2007-05-30

15 <150> 11/364,013
<151> 2006-02-28

<150> 10/810,165
<151> 2004-03-26

20 <150> 10/647,818
<151> 2003-08-22

<150> 10/603,000
<151> 2003-06-23

<150> 09/727,361
<151> 2000-11-29

25 <150> 09/415,278
<151> 1999-10-08

<160> 68

<170> PatentIn version 3.3

30 <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 1
Arg Tyr Trp Met Ser
1 5

40 <210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético

5

<400> 2

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

Asp

10

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético

<400> 3

Pro Asn Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10 15

20

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

30

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

35

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético

<400> 5

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

40

45

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
 sintético
 <400> 6
 10 Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 7
 <211> 124
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
 sintético
 <400> 7
 20 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg 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 Val Trp Val
 35 40 45
 Gly Glu Val Asn Pro Asp Ser Thr Ser Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu
 30 50 55 60
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Arg Pro Asn Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr His Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110
 40 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 45

<210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
 sintético
 <400> 8
 10 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 15 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 20 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Phe
 25 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 30 <210> 9
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
 sintético
 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Ile
 35 40 45
 45

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

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

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

Thr Arg Pro Asn Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr His Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 10
 atgragwcac akwcycaggt cttt 24

<210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

<400> 11
 atggagacag acacactcct gctat 25

<210> 12
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético

	<400> 12 atggagwcag acacactsct gytatgggt	29
5	<210> 13 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<220> <221> modificada_base <222> (27) <223> Inosina	
15	<400> 13 atgaggrccc ctgctcagwt tyttggnwtc tt	32
20	<210> 14 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
25	<400> 14 atgggcwtca agatgragtc acakwyycwg g	31
30	<210> 15 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
35	<400> 15 atgagtgtgc ycactcaggt cctggsgett	29
40	<210> 16 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
45		

	<400> 16 atgtggggay cgktttyamm cttttcaatt g	31
5	<210> 17 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
10		
	<400> 17 atggaagccc cagctcagct tctcttcc	28
15	<210> 18 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
20		
	<220> <221> modificada_base <222> (6) <223> Inosina	
25	<220> <221> modificada_base <222> (12) <223> Inosina	
	<220> <221> modificada_base <222> (18) <223> Inosina	
30		
	<400> 18 atgagmmkt cnmttcantt cytggg	26
35	<210> 19 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
40		
	<220> <221> modificada_base <222> (12) <223> Inosina	
45		

5	<220> <221> modificada_base <222> (24) <223> Inosina <400> 19 atgakgthcy cngctcagyt yctnrg	26
10	<210> 20 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
15	<400> 20 atggtrtccw casctcagtt ccttg	25
20	<210> 21 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
25	<400> 21 atgtatatat gtttggtgtc tattttct	27
30	<210> 22 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
35	<400> 22 atgaagttgc ctgtaggct gttggtgct	29
40	<210> 23 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
45		

	<400> 23 atggatttwc argtgcagat twtcagctt	29
5	<210> 24 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 24 atggtyctya tvtccttgct gttctgg	27
15	<210> 25 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 25 atggtyctya tvttretgct gctatgg	27
25	<210> 26 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 26 actggatggg gggaagatgg a	21
35	<210> 27 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 27 atggcctgga ytycwctywt mytct	25
45		

5	<210> 28 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
10	<220> <221> modificada_base <222> (15) <223> Inosina <400> 28 agctcytcwg wgganggygg raa	23
15	<210> 29 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético <400> 29 atgrasttsk ggytmarctk grttt	25
25	<210> 30 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético <400> 30 atgraatgsa sctgggtywt yctctt	26
35	<210> 31 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético <400> 31 atggactcca ggctcaattt agttttcct	29
45		

<210> 32
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> .Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador
 sintético
 <400> 32
 10 atggctgctcy trgbgctgyt cytctg 26
 <210> 33
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> .Secuencia Artificial
 15
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador
 sintético
 <400> 33
 20 atggvttggs tgtggamctt gcyattcct 29
 <210> 34
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> .Secuencia Artificial
 25
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador
 sintético
 <400> 34
 atgaaatgca gctggrtyat sttctt 26
 30
 <210> 35
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> .Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador
 sintético
 <400> 35
 atggrcagrc ttacwtyytc attcct 26
 40
 <210> 36
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> .Secuencia Artificial
 45

	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
5	<400>	36 atgatggtgt taagtcttct gtacct	26
	<210>	37	
	<211>	26	
	<212>	ADN	
10	<213>	.Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
15	<400>	37 atgggatgga gctrtatcat sytctt	26
	<210>	38	
	<211>	23	
	<212>	ADN	
20	<213>	.Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
25	<400>	38 atgaagwtgt ggbtraactg grt	23
	<210>	39	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
30	<213>	.Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<220>		
35	<221>	modificada_base	
	<222>	(15)	
	<223>	Inosina	
	<400>	39 atggratgga socknrtctt tmtct	25
40	<210>	40	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	.Secuencia Artificial	
45			

5	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético <400> 40 atgaacttyg ggytsagmtt grttt	25
10	<210> 41 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético <400> 41 atgtacttgg gactgagctg tgtat	25
20	<210> 42 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético <400> 42 atgagagtgc tgattctttt gtg	23
30	<210> 43 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético <400> 43 atggattttg ggctgatttt ttttattg	28
40	<210> 44 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	

<220>
 <221> modificada_base
 <222> (21)
 <223> Inosina
 5 <400> 44
 ccaggggccca rkkgatarac ngrtgg 26

<210> 45
 <211> 124
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 45
 Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 20 35 40 45

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

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

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

30 Thr Arg Pro Asn Tyr Tyr Gly Ser Arg Tyr His Tyr Tyr Ala Met Asp
 100 105 110

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

<210> 46
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

40 <400> 46
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

45

Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30

5 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

10 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Lys
 65 70 75 80

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

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

20 <210> 47
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 47
 gttgctacgc gtgtccactc cgaggtgaag ctgctcgagt ctggaggtgg cctgggtgcag 60
 cctggaggct ccctg 75

30 <210> 48
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 48
 ccagaaagc ttacctgagg aaacggtgac tgagg 35

40 <210> 49
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45

	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
5	<400>	49 gttgctacgc gtgtccactc cgagggtgcag cttgtcgagt ctggaggtgg cctgggtgc	58
	<210>	50	
	<211>	58	
	<212>	ADN	
10	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
15	<400>	50 ctggaggtgg cctgggtgcag cctggaggct ccctgagact ctctgtgca gcctcagg	58
	<210>	51	
	<211>	29	
	<212>	ADN	
20	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
25	<400>	51 gggaaagggc tagtgtgggt tggagaagt	29
	<210>	52	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
30	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
35	<400>	52 ccacactagc cctttccctg gagcc	25
	<210>	53	
	<211>	57	
	<212>	ADN	
40	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
45	<400>	53 tacgctgtac ctgcaaatga acagcctgag agctgaagac acagccgtgt attactg	57

5	<210> 54	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
10	<400> 54 atttgcaggt acagcgtatt tttggcgttg tctctggaga tggatgaatct atcctt	56
15	<210> 55	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
20	<400> 55 cccagaaagc ttacctgagg aaacggtgac cagggttcct tg	42
25	<210> 56	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
30	<400> 56 ctggagggtgg cctggtgcag cctggaggct ccctgagact ctcc	44
35	<210> 57	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
40	<400> 57 gggaaagggc tagtgtggat tggagaagt	29
45	<210> 58	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
5	<400>	58	
		atttgcaggt acagcgtatt tttggcgttg tctctggaga tggatgaattg	50
	<210>	59	
	<211>	37	
10	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
15	<400>	59	
		tcccaggcgc gcgatgtgat atccagatga cacagac	37
	<210>	60	
	<211>	68	
20	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
25	<400>	60	
		ctgccaggat ccaactgagg aagcaaagtt taaattctac tcacgtttta tttccaactt	60
		tgtcccg	68
	<210>	61	
30	<211>	54	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
35	<400>	61	
		tcccaggcgc gcgatgtgat atccagatga cacagtctcc atctccctg tctg	54
	<210>	62	
40	<211>	52	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
45			

	<400> 62	
	ctccatctctc cctgtctgcc tctgtgggag acagagtcac catcacttgc ag	52
5	<210> 63	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
10	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 63	
	cagaaaccag gtaaagctcc taaactcctg	30
15	<210> 64	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 64	
	caggagttta ggagctttac ctggtttctg	30
25	<210> 65	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 65	
	cagcctgcag cctgaagata ttgccactta ctattgccaa c	41
35	<210> 66	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 66	
	tcttcaggct gcaggctgct aatggtgaaa gtaaaatctg ttc	43
45		

	<210> 67	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 67	
10	gtttaaattc tactcacggtt ttatttccaa ctttgtcccc tggccgaacg	50
	<210> 68	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 68	
20	taagctcctg atctataatg c	21

TRADUCCION OFICIAL No. 2009-11-25-620
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

PCT/US2008/000978

Casilla No. VIII (ii) DECLARACION: FACULTAD PARA SOLICITAR Y QUE SE OTORQUE UNA PATENTE

La declaración debe ajustarse a la redacción estandarizada prevista en la Sección 212; ver las Notas a las Casillas Nos. VIII, VIII(i) a (v) (en general) y las Notas específicas a la Casilla No. VIII(ii). Si no se usa esta casilla, esta hoja no debe incluirse en la solicitud.

Declaración en cuanto a la facultad del solicitante, en la fecha de radicación internacional, a solicitar y que se le otorgue una patente (Reglas 4.17(ii) y 51bis.1(a)(ii), en un caso donde la declaración bajo la Regla 4.17(iv) no es apropiada:

en relación con la solicitud internacional:

ARIUS RESEARCH, INC. está facultada para solicitar y que se le otorgue una patente en virtud de lo siguiente:

un traspaso de:

YOUNG, David S.F., 33 University Avenue, Suite 2407, Toronto, Ontario M5J 2S7 CANADA;

FINDLAY, Helen P., 205 Glendonwyne Road, Toronto, Ontario M6P 3E9 CANADA;

HAHN, Susan E., 9 Innisfree Court, Toronto, Ontario M6S 3N7 CANADA;

CECHETTO, Lisa M., Unit 303 de JSD Ville II, 653-31 Hannam-dong, Yongsan-gu, Seúl 140-210 COREA DEL SUR; y

McCONKEY, Fortunata, RR#4, Shelburne, Ontario L0N 1S8 CANADA

a ARIUS RESEARCH, INC., fechado el 8 de mayo de 2006, 8 de mayo de 2006, 8 de mayo de 2006, 8 de mayo de 2006 y 8 de mayo de 2006, respectivamente.

☐ Esta declaración continúa en la página siguiente, "Continuación de la Casilla No. VIII(ii)".

Formato PCT/RO/101 (hoja de declaración (ii)) (enero de 2004) Ver Notas al formato de solicitud

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 24 de noviembre de 2009, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

Box No. VIII (ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII (i) to (v) (in general) and the specific Notes to Box No. VIII (ii). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

in relation to this international application:

ARIUS RESEARCH, INC. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

an assignment from:

YOUNG, David S. F., 33 University Avenue, Suite 2407, Toronto, Ontario M5J 2S7 CANADA;
FINDLAY, Helen P., 205 Glendonwynne Road, Toronto, Ontario M6P 3E9 CANADA;
HAHN, Susan E., 9 Innisfree Court, Toronto, Ontario M6S 3N7 CANADA;
CECHETTO, Lisa M., Unit 303 of JSD Ville II, 653-31 Hannam-dong, Yongsan-gu, Seoul 140-210 SOUTH KOREA; and
McCONKEY, Fortunata, RR#4, Shelburne, Ontario L0N 1S8 CANADA

to ARIUS RESEARCH, INC., dated 8 May 2006, 8 May 2006, 8 May 2006, 8 May 2006, and 8 May 2006, respectively.

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII (ii)".

ANTICUERPOS ANTI-CD44 QUIMÉRICOS Y HUMANIZADOS QUE MEDIAN LA

CITOTOXICIDAD DE CÉLULAS DE CÁNCER

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

El CD44, una glicoproteína de unión a ácido hialurónico (HA) de cadena individual, se expresa en una variedad de tejidos normales, todas las células hematopoyéticas y varios tejidos de cáncer. Un anticuerpo monoclonal contra CD44 del hibridoma H460-16-2, depositado con la ATCC como PTA-4621, se mostró anteriormente que es un anticuerpo modificador de enfermedad cancerosa (CDMAB), que impide el crecimiento del tumor y que reduce la carga tumoral en modelos de cáncer incluyendo cáncer de próstata y mama por citotoxicidad. Las regiones variables de este anticuerpo monoclonal también se aislaron y se secuenciaron para generar un anticuerpo quimérico que tiene actividad anti-cáncer mejorada con respecto al anticuerpo monoclonal. Ahora, se generan anticuerpos humanizados que tienen actividad similar de unión a CD44 como el anticuerpo monoclonal PTA-4621 de origen. Los anticuerpos monoclonales, quiméricos y humanizados se pueden conjugar a toxinas, enzimas, compuestos radioactivos, citocinas, interferones, porciones objetivo o indicadoras y células hematogenas para tratar cáncer. Estos anticuerpos también se usan en ensayos de unión para determinar la expresión de CD44 en células.

**ANTICUERPOS ANTI-CD44 QUIMÉRICOS Y HUMANIZADOS QUE MEDIAN LA
CITOTOXICIDAD DE CÉLULAS DE CÁNCER**

Campo de la Invención

Esta invención se refiere a la diagnosis y tratamiento de enfermedades cancerosas, particularmente a la mediación de la citotoxicidad de células tumorales, y de manera más particular al uso de anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa (CDMAB, por sus siglas en inglés), opcionalmente en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos/CDMAB, como un medio para iniciar la respuesta citotóxica. La invención se refiere además a ensayos de unión, que utilizan los CDMAB de la presente invención.

Antecedentes de la Invención

CD44 en Cáncer: La formulación de anticuerpos monoclonales contra células sanguíneas blancas humanas condujo al descubrimiento del antígeno CD44; una glicoproteína de unión al ácido hialurónico (HA) de cadena individual expresada en una amplia variedad de tejidos normales y en todos los tipos de células hematopoyéticas. Originalmente se asoció con la activación y retorno dirigido de los linfocitos. Actualmente, su papel fisiológico putativo también incluye la activación de genes inflamatorios, la modulación del ciclo celular, la inducción de la proliferación celular, la inducción de la diferenciación y

desarrollo, la inducción de la reorganización citoesquelética y la migración celular y la supervivencia/resistencia celular a la apoptosis.

En humanos, la copia de gen individual de CD44 está localizada en el brazo corto del cromosoma 11, 11p13. El gen contiene 19 exones; los primeros 5 son constantes, los siguientes 9 son variantes, los siguientes 3 son constantes y los 2 finales son variantes. El empalme diferencial puede conducir a más de 1000 isoformas diferentes. Sin embargo, actualmente sólo se han identificado varias docenas de variantes que se presentan de manera natural.

La glicoproteína normal CD44 consiste de un dominio extracelular N-terminal (que incluye una secuencia guía de 20 a.a., y una región próxima de membrana (85 a.a.)) dominio (270 a.a.), una región transmembrana (21 a.a.) y una extremidad citoplásmica (72 a.a.). La región extracelular también contiene un módulo de enlace al N-término. Esta región es de 92 a.a. de longitud y muestra homología a otras proteínas de enlace de unión HA. Hay alta homología entre las formas de ratón y de humano de CD44. Las formas variantes de la proteína se insertan al término carboxi del exón 5 y están localizadas extracelularmente cuando se estresan.

Una forma soluble en suero de CD44 también se presenta de manera natural y puede provenir de ya sea un codón finalizador (dentro de la región variable) o de la

actividad proteolítica. La activación de células de una variedad de estímulos que incluyen TNF- α da por resultado el desprendimiento del receptor de CD44. El desprendimiento del receptor también se ha visto con células tumorales y puede dar por resultado un incremento en la concentración en suero humano de CD44 por hasta 10 veces. La alta concentración en suero de CD44 sugiere malignidad (cáncer ovárico que es la excepción).

La forma normal de CD44 existe con un peso molecular de aproximadamente 37 kD. Las modificaciones post-transduccionales incrementan el peso molecular a 80-90 kD. Estas modificaciones incluyen las glicosilaciones N-enlazadas de dominio extracelular de amino-término en los residuos de asparagina, las glicosilaciones O-enlazadas en los residuos de serina/treonina en el término carboxi del dominio extracelular y las adiciones de glicosaminoglicano. Las variantes de empalme pueden variar de tamaño desde 80-250 kD.

El HA, un polisacárido localizado en la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) en mamíferos, se piensa que es el ligando primario de CD44. Sin embargo, también se ha encontrado que CD44 se une a proteínas tal como colágeno, fibronectina, laminina etc. Parece haber una correlación entre la unión a HA y la glicosilación. El CD44 inactivo (que no se une a HA) tiene los niveles más altos de glicosilación, el CD44 activo (que se une a HA), el más bajo

en tanto que el CD44 inducible (que no se une o se une débilmente a HA, a menos que se active por citocinas, anticuerpos monoclonales, factores de crecimiento, etc.) tiene niveles de glicosilación en algún lugar entre las formas activas e inactivas.

El CD44 puede mediar algunas de sus funciones a través de las rutas de transducción de señales que dependen de la interacción de la célula, de los estímulos y del ambiente. Algunas de estas rutas incluyen la cascada de señalización de NF κ B (comprendida en la respuesta inflamatoria), la ruta de transducción de señal de Ras-MAPK (comprendida con la activación del ciclo y proliferación celular), la familia Rho de proteínas (comprendida con la reorganización citoesquelética y la migración celular), y la ruta de señalización relacionada a PI3-K (relacionada a supervivencia celular). Todas las funciones mencionadas anteriormente están cercanamente relacionadas con el inicio y progreso de la enfermedad tumoral. También se ha implicado el CD44 como que juega un papel en cáncer a través de una variedad de mecanismos adicionales. Estos incluyen la presentación de factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas por proteoglicanos de superficie celular presentes en la superficie celular de CD44 a receptores comprendidos en la malignidad. También, la degradación intracelular de HA por hialuronidasas lisosomales después de la internalización del

complejo CD44-HA pueden incrementar potencialmente la probabilidad de invasión tumoral y de la inducción de la angiogénesis a través de la ECM. Además, la transmisión de señales apoptóticas o de supervivencia se ha mostrado que se presenta a través de ya sea el receptor normal o variable de CD44. También se ha sugerido que CD44 está comprendido en la diferenciación y migración celular. Muchos, sino es que todos, de estos mecanismos son dependientes del ambiente de las células y varios dan lugar a hallazgos variables. Por lo tanto, se requiere más investigación antes de que se pueda redactar cualquier conclusión.

A fin de validar un papel funcional potencial de CD44 en cáncer, se emprendieron estudios de expresión de CD44 para determinar si la expresión diferencial del receptor correlaciona con el progreso de la enfermedad. Sin embargo, se observaron hallazgos inconsistentes en la mayoría de los tipos tumorales y esto es probablemente debido a una combinación de reactivos, a la técnica, a la puntuación patológica y a las diferencias de los tipos celulares entre los investigadores. El carcinoma de células renales y el linfoma no de Hodgkin parecen ser la excepción ya que pacientes con tumores que expresan un alto contenido de CD44 tienen consistentemente tiempos más breves de supervivencia que sus contrapartes con baja o ninguna expresión de CD44.

Debido a su asociación con cáncer, el CD44 ha sido

el objetivo del desarrollo de productos terapéuticos anti-cáncer. Aún existe la controversia con respecto a si las formas normales o variantes de CD44 se requieren para el progreso tumoral. Existen datos de animales *in vivo* para soportar ambas perspectivas y nuevamente puede ser dependiente del tipo de tumor o aún dependiente del tipo celular. Los diferentes planteamientos terapéuticos han incluido la inyección de proteínas solubles de CD44, ADNc de hialuronan-sintasa, hialuronidasa, el uso de anticuerpos antisentido de CD44 y específicos de CD44. Cada planteamiento ha conducido a algún grado de éxito, proporcionando de este modo soporte para productos terapéuticos de cáncer anti-CD44.

Se han generado experimentalmente anticuerpos monoclonales específicos de CD44 tanto variantes como normales, pero para la mayor parte, estos anticuerpos no tienen actividad biológica intrínseca, más bien se unen de manera específica al tipo de CD44 que reconocen. Sin embargo, hay algunos que son ya sea activos *in vitro* o *in vivo* pero en general no lo son ambos. Se ha mostrado que varios anticuerpos anti-CD44 median los eventos celulares. Por ejemplo, el anticuerpo murino A3D8, dirigido contra la forma normal del antígeno CD44 Luterano de eritrocitos humanos, se mostró que mejora la activación de células T mediada por CD2 (anticuerpo 9-1) y CD3 (anticuerpo OKT3); otro anticuerpo anti-CD44 tiene efectos similares. A3D8 también indujo la

liberación de IL-1 de monocitos y la liberación de IL-2 de linfocitos T. De manera interesante, el uso de A3D8 en la conjugación con fármacos tal como daunorubicina, mitoxantrona y etopósido inhibió la inducción de apoptosis en células HL60 y NB4 AML al anular la generación del segundo mensajero ceramida. El anticuerpo J173 que no tiene actividad intrínseca y se dirige contra un epítipo similar de los CD44, no inhibe la apoptosis inducida por fármaco. También, el anticuerpo monoclonal A3D8 y otro anticuerpo monoclonal anti-CD44, H90, así como hialuronano, indujeron diferenciación en emblastos leucémicos de pacientes con leucemia mieloide aguda (AML, por sus siglas en inglés). En el mismo estudio, sin embargo, el anticuerpo J173 que también se une a la forma normal de CD44, no induce diferenciación de las mismas células. De manera interesante, H90 no se une a las células de AML de un subgrupo de pacientes cuyas células de AML se unieron por J173, indicando que estos anticuerpos reconocen distintos epítopos. En un estudio separado, tanto A3D8 como H90 indujeron diferenciación terminal de varias líneas de células derivadas de AML. El anticuerpo NIH44-1, dirigido contra una forma de 85-110 kD y 200 kD de CD44, aumentó la proliferación de células T a través de una ruta que los autores especularon como la reticulación o la agregación de CD44. Tomados conjuntamente, no hay evidencia que los anticuerpos tal como estos sean adecuados para el uso como

productos terapéuticos de cáncer puesto que ni se dirigen contra cáncer (por ejemplo linfocitos activados), induce la proliferación celular, o cuando se usan con agentes citotóxicos se inhibieron la muerte inducida por fármaco de las células de cáncer.

Se han descrito varios anticuerpos anti-CD44 que demuestran efectos anti-tumor *in vivo*. El anticuerpo H90 es un anticuerpo monoclonal de ratón generado por inmunización de ratones con eritrocitos (RBC, por sus siglas en inglés) humanas, y que se unen supuestamente a todas las isoformas de CD44. La administración de este anticuerpo, tres veces por semana durante cuatro semanas, a ratones NOD-SCID irradiados que se han inoculado con células humanas de AML, bloqueó la re-población por estas células. Además, el pasaje en serie de las células de AML de estos animales falló en re-poblar los ratones receptores cuando las células obtuvieron de animales que se han sometido a tratamiento con el anticuerpo H90. El efecto de este anticuerpo parece ser mediado por interferencia con la diferenciación de células madre leucémicas y con la interacción de las células de AML con el nicho apropiado. Además, la re-población de los animales NOD-SCID irradiados con células madre sanguínea de cordón humano no se deterioró por el tratamiento, indicando un efecto selectivo del anticuerpo y también importantes diferencias fenotípicas entre AML y células madre hematopoyéticas,

humanas, normales.

El anticuerpo 1.1ASML, una IgG1 de ratón dirigida a la variante v6 de CD44, ha mostrado que disminuye la metástasis de nódulos linfáticos y pulmón del adenocarcinoma pancreático de rata BSp73ASML. Se incrementó de manera concomitante la supervivencia de los animales tratados. El anticuerpo sólo fue efectivo si se administra antes de la colonización de los nódulos linfáticos, y se postuló que interfiere con la proliferación celular en el nódulo linfático. No hubo citotoxicidad directa del anticuerpo en las células tumorales *in vitro*, y el anticuerpo no mejora la citotoxicidad mediada por complementó, o función de células efectoras inmunitarias. No se describió la utilidad del anticuerpo contra células humanas.

Breyer et al., describieron el uso de un anticuerpo comercialmente disponible para CD44 para interrumpir el progreso de un glioblastoma de rata por tópicamente implantado. La línea celular C6 de glioblastoma de rata se implantó en el lóbulo frontal, y después de 1 semana, a las ratas se les dio 3 tratamientos con anticuerpo con inyección intracerebral. Las ratas tratadas demostraron crecimiento tumoral disminuido, y mayor peso corporal que las ratas tratadas con control de isotipo amortiguador. El anticuerpo fue capaz de inhibir la adhesión de células *in vitro* a cubreobjetos revestidos con componentes de matriz

extracelular, pero no tienen ningún efecto citotóxico directo en las células. Este anticuerpo no se probó contra células humanas.

Se llevó a cabo un estudio que comparó la eficiencia de un anticuerpo a los CD44 (IM-7.8.1) a un anticuerpo a CD44v10 (K926). La línea de melanoma murino altamente metastática B16F10, que expresa ambas isoformas de CD44, se implantó intravenosamente en ratones. Después de 2 días, se dan anticuerpos cada tercer día durante la duración del estudio. Ambos anticuerpos provocaron una reducción significativa de más de 50 por ciento en el número de metástasis pulmonar; no hubo diferencias significativas en eficiencia entre los dos anticuerpos. El anticuerpo no afecta la proliferación *in vitro*, y los autores, Zawadzki et al., especularon que la inhibición del crecimiento tumoral fue debida a que el anticuerpo bloquea la interacción de CD44 con su ligando. En otro estudio que usa IM-7.8.1, Zahalka et al., demostró que el anticuerpo y su fragmento F(ab')₂ fueron capaces de bloquear la infiltración de nódulos linfáticos por el linfoma LB de células T murinas. Esto confirió un beneficio significativo de supervivencia a los ratones. Wallach-Dayán et al., mostraron que la transfección del linfoma murino LB-TR, que no forma espontáneamente tumores, con CD44v4-v10 confirió la capacidad para formar tumores. La administración de IM-7.8.1 disminuyó el tamaño del tumor de

las células transfectadas, implantadas en comparación anticuerpo de control de isotipo. Ninguno de estos estudios demostró utilidad humana para este anticuerpo.

La GKW.A3, una IgG2a de ratón, es específica para CD44 humano e impide la formación de metástasis de un xenoinjerto de melanoma humano en ratones SCID. El anticuerpo se mezcló con la línea de células humanas metastáticas SMMU-2, y luego se inyectó de manera subcutánea. Los tratamientos se continuaron durante las siguientes 3 semanas. Después de 4 semanas, solo 1 de 10 ratones desarrollaron un tumor en el sitio de inyección, en comparación a 100 por ciento de animales no tratados. Los fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo demostraron la misma inhibición de la formación de tumor, sugiriendo que el mecanismo de acción no fue dependiente de la citotoxicidad celular dependiente del complemento de anticuerpo. Si las células tumorales se inyectaron una semana antes a la primera inyección del anticuerpo, 80 por ciento de los animales desarrollaron tumores en el sitio primario. Sin embargo, se notó que el tiempo de supervivencia se incrementó de manera aún más significativa. Aunque la administración retrasada de anticuerpo no tiene efecto en la formación de tumores primarios, impide completamente la metástasis al pulmón, riñón, glándula suprarrenal, hígado y peritoneo que estuvieron presentes en los animales tratados. Este anticuerpo no tiene ninguna citotoxicidad directa en la línea

celular *in vitro* ni interfiere con la proliferación de las células SMMU-2, y parece tener su efecto principal en la formación tumoral al afectar la metástasis o crecimiento. Una característica notable de este anticuerpo fue que reconoció todas las isoformas de CD44, que sugiere posibilidades limitadas para uso terapéutico.

Strobel et al., describen el uso de un anticuerpo anti-CD44 (clon 515) para inhibir la implantación peritoneal de células humanas de cáncer de ovario en un modelo de xenoinjerto de ratón. La línea de células ováricas humanas 36M2 se implantó intraperitonealmente en ratones en la presencia del anticuerpo anti-CD44 o el anticuerpo de control, y luego se administraron tratamientos durante los siguientes 20 días. Después de 5 semanas, hubo significativamente menos nódulos en la cavidad peritoneal en el grupo tratado con anticuerpo. Los nódulos tanto de los grupos tratados con control como con anti-CD44, fueron del mismo tamaño, sugiriendo que una vez que se han implantado las células, el anticuerpo no tiene efecto en el crecimiento tumoral. Cuando las células se implantaron de manera subcutánea, tampoco hubo efecto en el crecimiento tumoral, indicando que el número de anticuerpo mismo no tiene un efecto anti-proliferativo o citotóxico. Además, no hubo efecto del anticuerpo en el crecimiento celular *in vitro*.

El VFF-18, también designado como BIWA 1, es un

anticuerpo de alta afinidad a la variante v6 de CD44 específico para la región 360-370 del polipéptido. Este anticuerpo se ha usado como un conjugado marcado con ^{99m}Tc en un ensayo clínico de Fase 1 en 12 pacientes. El anticuerpo se probó para seguridad y selección potencial de objetivos en pacientes con carcinoma de células escamosas de la cabeza y cuello. Cuarenta horas después de la inyección, 14 por ciento de la dosis inyectada se tomó por el tumor, con la acumulación mínima de otros órganos incluyendo el riñón, bazo y médula ósea. La unión altamente selectiva de tumor sugiere un papel para este anticuerpo en radioinmunoterapia, aunque la afinidad excepcionalmente alta de este anticuerpo impide la penetración en las capas más profundas del tumor. Limitando adicionalmente la aplicación de BIWA 1 está la inmunogenicidad del anticuerpo murino (11 a 12 pacientes desarrollaron anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA)), la acumulación heteróloga a todo lo largo del tumor y la formación de complejos de anticuerpo CD44 soluble. La WO 02/094879 describe una versión humanizada de VFF-18 diseñada para superar la respuesta de HAMA, designado BIWA 4. El BIWA 4 se encontró que tiene una afinidad de unión a antígeno significativamente menor que el anticuerpo VFF 18 de origen. De manera sorprendente, el anticuerpo de BIWA 4 de menor afinidad tiene características superiores de toma en tumor que el anticuerpo VFF-18 humanizado de BIWA 8 de mayor

afinidad. Tanto los anticuerpos de BIWA 4 marcados con ^{99m}Tc y marcadas con ^{186}Re se valoraron en un ensayo clínico de Fase 1 de 33 pacientes para determinar la seguridad, tolerabilidad, acumulación tumoral y dosis toleradas más máxima, en el caso de BIWA 4 marcado con ^{186}Re . Parece haber captación relacionada a tumor de BIWA 4 marcado con ^{99m}Tc . No hubo respuestas tumorales vistas con todas las dosis de BIWA 4 marcado con ^{186}Re , aunque un número tiene enfermedad estable; la toxicidad limitante de dosis se presentó a 60 mCi/m^2 . Hubo una proporción de 50-65 por ciento de eventos adversos con 12 de 33 pacientes juzgados como que tienen eventos adversos serios (trombocitopenia, leucopenia y fiebre) y de estos 6, todos tratados con BIWA 4 marcado con ^{186}Re , murieron en el transcurso del tratamiento o del seguimiento debido al progreso de la enfermedad. Los pacientes desarrollaron anticuerpos humanos anti-humanos (HAAA). Un ensayo de escala de dosis de Fase I de BIWA 4 marcado con ^{186}Re se llevó a cabo en 20 pacientes. Se observaron la mucositis oral y la trombocitopenia y leucocitopenia limitantes de dosis; un paciente desarrolló una respuesta de HAAA. La enfermedad estable se vio en 5 pacientes tratados a la dosis más alta de 60 mCi/m^2 . Aunque se juzgó que es aceptable tanto en seguridad como en tolerabilidad para la eficiencia lograda, estos estudios tienen mayores proporciones de eventos adversos en

comparación a otras terapias biológicas conjugadas sin radioisótopos en estudios clínicos. La solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2003/0103985 describe una versión humanizada de VFF-18 conjugado a un maitansinoide, designado de BIWI 1, para el uso en terapia tumoral. Un anticuerpo VFF 18 humanizado, BIWA 4, cuando se conjugó a una toxina, es decir, BIWI 1, se encontró que tiene significativos efectos anti-tumor en modelos de ratón de carcinoma epidermoide humano de la vulva, carcinoma de células escamosas de la faringe o carcinoma de mama. La versión no conjugada BIWA 4, no tiene efectos anti-tumor. En un ensayo de Fase 1 de BIWI 1, con pacientes afectados por cáncer incurable de cabeza y cuello, no se pudo determinar la dosis máxima tolerada debido a la interrupción prematura del ensayo debido a muerte de uno de los pacientes como resultado de toxicidad cutánea masiva. En un segundo ensayo paralelo de BIWI 1, también con pacientes con cáncer de cabeza y cuello se determinó MTD y fue el resultado de la toxicidad cutánea. En un tercer ensayo con BIWI 1, con pacientes con cáncer metastásico de mama que se ha sometido anteriormente a quimioterapia, las toxicidades más comunes fueron trastornos moderados y momentáneos de la piel. En este estudio, aunque no hubo medida objetiva de eficiencia, 50 por ciento de los pacientes tratados mostró enfermedad estable independiente de la dosis. Un riesgo negativo total versus valoración de eficiencia de todos los

ensayos, debido a la carencia de predictibilidad de eventos fatales dio por resultado discontinuación de desarrollo adicional de este fármaco.

El Mab U36 es un anticuerpo de IgG1 monoclonal murino generado por inmunización de células de carcinoma hipofaríngeal humano UM-SCC-22B y selección a la especificidad de tejido y cáncer. La caracterización del antígeno a través del análisis de secuencia y clonación de ADNc identificó el dominio v6 de la variante de empalme de CD44 específicas de queratinocitos, epican como el objetivo de Mab U36. Los estudios de inmunohistoquímica muestran que el epítipo está restringido a la membrana celular. Adicionalmente Mab U36 marcó 94 por ciento de los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC, por sus siglas en inglés) fuertemente, y dentro de estos tumores hubo uniformidad en la tinción celular. Un estudio con Mab U36 marcado con ^{99m}Tc de 10 pacientes mostró acumulación selectiva del anticuerpo a los cánceres de HNSCC (20.4 +/- 12.4 por ciento de dosis inyectada/kg en 2 días); no se reportaron efectos adversos pero dos pacientes desarrollaron HAMA. En un estudio de Mab U36 murino radio-yodado hubo 3 casos de HAMA en 18 pacientes y captación homogénea selectiva en HNSCC. A fin de disminuir la antigenicidad de Mab U36 y disminuir la proporción de HAMA, se construyó un anticuerpo híbrido. Ni el Mab U36 híbrido ni original murino tuvo actividad de ADCC. No

hubo evidencia de actividad funcional nativa de Mab U36. Se usó Mab U36 híbrido marcado con ^{186}Re para determinar la utilidad de Mab U36 como un agente terapéutico. En este ensayo de dosis a escala de Fase 1, 13 pacientes recibieron una dosis de exploración de Mab U36 híbrido marcado con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ seguido por Mab U36 híbrido marcado con ^{186}Re . No hubo eventos adversos agudos reportados pero después del tratamiento se observaron mielotoxicidad limitante de dosis (1.5 GBq/m^2) en 2 de 3 pacientes, y trombocitopenia en un paciente tratado con la dosis máxima (1.0 GBq/m^2) tolerada. Aunque hubo algunos efectos en el tamaño del tumor, estos efectos no cumplen con los criterios de respuestas objetivo al tratamiento. Un estudio adicional de Mab U36 híbrido marcado con ^{186}Re empleó una estrategia de usar factor estimulador de colonia de granulocitos estimuló la re-infusión de sangre entera para duplicar la actividad máxima tolerada a 2.8 Gy. En este estudio de nueve pacientes con varios tumores de la cabeza y cuello, 3 requirieron transfusiones por la anemia relacionada al fármaco. Otra toxicidad incluye mielotoxicidad grado 3, y mucositis grado 2. No se reportaron respuestas tumorales objetivas aunque se logró enfermedad estable durante 3-5 meses en 5 pacientes. De esta manera, se puede ver que aunque Mab U36 es un anticuerpo altamente específico, la desventaja de requerir un radioinmunoconjugado para lograr efectos anti-cáncer limita su utilidad debido a la toxicidad asociada con

terapia con relación a los efectos clínicos logrados.

Para resumir, se ha mostrado que los anticuerpos monoclonales CD44v6 (1.1ASML) y CD44v10 (K926) reducen la actividad metastática en ratas inyectadas con un adenocarcinoma pancreático metastásico o ratones inyectados con melanoma maligno, respectivamente. Se ha mostrado que otro anticuerpo anti-CD44v6 (VFF-18 y sus derivados), solo cuando se conjuga a un maitansinoide o un radioisótopo, tiene efectos anti-tumor. También se ha mostrado que los anticuerpos monoclonales anti-CD44 normales suprimen el progreso intracerebral por glioblastoma de rata (anti-CD44), invasión de nódulos linfáticos, por linfoma de células T de ratón (IM-7.8.1) así como inhiben la implantación de una línea de células de cáncer ovárico humano en ratones desnudos (clon 515), la metástasis pulmonar de una línea de células de melanoma de ratón (IM-7.8.1) y la metástasis de una línea de células de melanoma humano en ratones SCID (GKW.A3). El anticuerpo anti-CD44v6 Mab U36 conjugado a radioisótopo y a sus derivados tiene actividad anti-tumor en ensayos clínicos que se acompañaron por toxicidad significativa. Estos resultados, aunque son alentadores y soportan el desarrollo de anticuerpos monoclonales anti-CD44 como potenciales terapéuticos de cáncer, demuestran efectividad limitada, seguridad limitada, o aplicabilidad limitada a cánceres humanos.

De esta manera, si se aislara una composición de anticuerpos que medie la citotoxicidad de células cancerosas, como una función de su atracción a la expresión en superficie celular de CD44 en células, se realizaría un procedimiento terapéutico y de diagnóstico valioso.

Anticuerpos Monoclonales como Terapia de Cáncer: Cada individuo quien se presenta con cáncer es único y tiene un cáncer que es tan diferente de otros cánceres como la identidad de esa persona. A pesar de esto, la terapia actual trata todos los pacientes con el mismo tipo de cáncer, en la misma etapa, de la misma manera. Al menos 30 por ciento de estos pacientes fallarán la terapia de primera línea, conduciendo de este modo a rondas adicionales de tratamiento y a la probabilidad incrementada de falla de tratamiento, de metástasis y generalmente de muerte. Un planteamiento superior al tratamiento sería la adecuación de la terapia para el individuo particular. La terapia única actual que se presta por sí misma a la adecuación es la cirugía. La quimioterapia y el tratamiento de radiación no se pueden adaptar al paciente, y la cirugía por sí misma, en muchos casos es inadecuada para producir curaciones.

Con el advenimiento de los anticuerpos monoclonales, llega a ser más realista la posibilidad de desarrollar métodos para una terapia adecuada puesto que cada anticuerpo se puede dirigir a un epítipo individual. Además,

es posible producir una combinación de anticuerpos que se dirigen a la constelación de epítomos que definen finalmente el tumor de un individuo particular.

Habiendo reconocido que una diferencia significativa entre las células normales y cancerosas es que las células cancerosas contienen antígenos que son específicos a las células transformadas, la comunidad científica ha mantenido por largo tiempo que los anticuerpos monoclonales se pueden diseñar para seleccionar específicamente como objetivo células transformadas al unirse específicamente a estos antígenos de cáncer; dando lugar de este modo a la creencia que los anticuerpos monoclonales pueden servir como "Municiones Mágicas" para eliminar células de cáncer. Sin embargo, ahora no se reconoce ampliamente que el anticuerpo monoclonal individual pueda servir en todos los casos de cáncer, y que se pueden desplegar anticuerpos monoclonales, como una clase, como tratamientos dirigidos de cáncer. Se ha mostrado que los anticuerpos monoclonales aislados de acuerdo con las enseñanzas de la invención actualmente descrita modifican el proceso de la enfermedad cancerosa de una manera que es benéfico al paciente, por ejemplo, al reducir la carga tumoral, y se referirán de manera variada en la presente como anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa (CDMAB) o anticuerpos "anti-cáncer".

En el momento actual, el paciente con cáncer tiene

usualmente pocas opciones de tratamiento. El planteamiento de régimen a la terapia de cáncer ha producido mejoras en las proporciones de morbilidad y supervivencia global. Sin embargo, al individuo particular, estas estadísticas mejoradas no correlacionan necesariamente con una mejorar en su situación personal.

De esta manera, si se planteará una metodología que permitiera que el practicante tratara cada tumor independientemente de otros pacientes en el mismo cohorte, esto permitiría el planteamiento único de adaptar la terapia a solo esa persona. Este curso de terapia incrementaría de manera ideal la proporción de curaciones, y produciría mejores resultados, satisfaciendo de este modo una necesidad largamente percibida.

Históricamente, el uso de anticuerpos policlonales se ha usado con éxito limitado en el tratamiento de cánceres humanos. Se han tratado linfomas y leucemias con plasma humano, pero hay poca remisión prolongada o pocas respuestas. Además, existe una carencia de reproducibilidad y no hay beneficio adicional en comparación a la quimioterapia. Los tumores sólidos tal como los cánceres de mama, melanomas y carcinomas de células renales también se han tratado con sangre humana, suero de chimpancé, plasma humano y suero de caballo con resultados correspondientemente impredecibles en efectivos.

Han habido muchos ensayos clínicos de anticuerpos monoclonales para tumores sólidos. En los 80, hubo al menos cuatro ensayos clínicos para cáncer humano de mama que produjeron solo un respondedor para al menos 47 pacientes usando anticuerpos contra antígenos específicos o a base de selectividad de tejido. No fue hasta 1998 que hubo un ensayo clínico exitoso que usó un anticuerpo anti-Her2/neu humanizado (Herceptin^{MR}) en combinación con CISPLATIN. En este ensayo, se valoraron 37 pacientes para respuestas de los cuales aproximadamente un cuarto tuvieron una proporción de respuesta parcial y un cuarto adicional tuvo progreso menor o estable de la enfermedad. En tiempo medio al progreso entre los respondedores fue de 8.4 meses con una duración media de respuestas de 5.3 meses.

El Herceptin^{MR} se probó en 1998 para uso de primera línea en combinación con Taxol^{MR}. Los resultados del estudio clínico mostraron un incremento en el tiempo medio al progreso de la enfermedad para aquellos quienes recibieron terapia de anticuerpo más Taxol^{MR} (6.9 meses) en comparación al grupo que recibió Taxol^{MR} solo (3.0 meses). También hubo un ligero incremento en la supervivencia media; 22 versus 18 meses para el brazo de tratamiento de Herceptin^{MR} más Taxol^{MR} versus el brazo del tratamiento solo con Taxol^{MR}. Además, hubo un incremento en el número tanto de respondedores completos (8 versus 2 por ciento) y parciales (34 versus 15 por ciento)

en el grupo de combinación de anticuerpo más Taxol^{MR} en comparación a Taxol^{MR} solo. Sin embargo el tratamiento con Herceptin^{MR} y Taxol^{MR} condujo a una mayor incidencia de cardiotoxicidad en comparación al tratamiento solo con Taxol^{MR} (13 versus 1 por ciento respectivamente). También, la terapia de Herceptin^{MR} solo fue efectiva para pacientes quienes sobreexpresaron (como se determina a través de un análisis de inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés)) el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2/neu), un receptor, que actualmente no tiene función conocida ni ligando biológicamente importante; aproximadamente 25 por ciento de los pacientes quienes tuvieron cáncer metastásico de mama. Por lo tanto, aún existe una gran necesidad no satisfecha para pacientes con cáncer de mama. Aún aquellos quienes puedan beneficiarse del tratamiento con Herceptin^{MR} requerirán aún quimioterapia y en consecuencia aún tendrán de tratar con, al menos en algún grado, los efectos secundarios de esta clase de tratamiento.

Los ensayos clínicos que investigan el cáncer colorrectal comprenden anticuerpos tanto contra objetivo de glicoproteína como de glicolípido. Los anticuerpos tal como 17-1A, que tienen alguna especificidad para adenocarcinomas, se han sometido a ensayos clínicos de Fase 2 en más de 60 pacientes con solo 1 paciente que tiene una respuesta parcial. En otros ensayos, el uso de 17-1A produjo solo 1 respuesta

completa y 2 respuestas menores entre 52 pacientes en protocolos que usan ciclofosfamida adicional. A la fecha, los ensayos clínicos de Fase III de 17-1A no han demostrado eficiencia mejorada como terapia adyuvante para cáncer de colon de etapa III. El uso de un anticuerpo monoclonal murino humanizado ha probado inicialmente para formación de imágenes tan poco produjo regresión tumoral.

Sólo recientemente ha habido algunos resultados positivos de los estudios clínicos de cáncer colorrectal con el uso de anticuerpos monoclonales. En 2004 se probó ERBITUX^{MR} para el tratamiento de segunda línea de pacientes con cáncer colorrectal metastásico que expresa EGFR quienes son resistentes a quimioterapia basada en irinotecan. Los resultados tanto de un estudio clínico de Fase II de dos brazos como de un estudio de un solo brazo mostraron que ERBITUX^{MR} en combinación con irinotecan tiene una proporción de respuesta de 23 y 15 por ciento respectivamente con un tiempo medio al progreso de la enfermedad de 4.1 y 6.5 meses respectivamente. Los resultados del mismo estudio clínico de Fase II de dos brazos y de otro estudio de un solo brazo mostraron que el tratamiento con ERBITUX^{MR} solo dio por resultado una proporción de respuesta de 11 y 9 por ciento respectivamente con un tiempo medio al progreso de la enfermedad de 1.5 y 4.2 meses respectivamente.

En consecuencia tanto en Suiza como en los Estados

Unidos, el tratamiento de ERBITUX^{MR} en combinación con irinotecan, y en los estados unidos, el tratamiento único con ERBITUX^{MR}, se ha probado como un tratamiento de segunda línea de pacientes con cáncer de colon quienes han fallado a la terapia de primera línea con irinotecan. Por lo tanto, al igual que Herceptin^{MR}, el tratamiento en Suiza solo está probado como una combinación de anticuerpo monoclonal y quimioterapia. Además, el tratamiento tanto en Suiza como en los Estados Unidos solo se aprueba para pacientes como una terapia de segunda línea. También, en 2004, se probó AVASTIN^{MR} para el uso en combinación con quimioterapia intravenosa basada en 5-fluorouracilo como un tratamiento de primera línea de cáncer colorrectal metastásico. Los resultados de un estudio clínico de Fase III demostraron una prolongación en la supervivencia media de pacientes tratados con AVASTIN^{MR} más 5-fluorouracilo en comparación a pacientes tratados con 5-fluorouracilo solo (20 meses versus 16 meses respectivamente). Sin embargo, nuevamente igual que Herceptin^{MR} y ERBITUX^{MR}, el tratamiento solo se prueba como una combinación de anticuerpo monoclonal y quimioterapia.

También continúa habiendo pobres resultados para cáncer de pulmón, de cerebro, de ovario, pancreático, de próstata y de estómago. Los recientes resultados más promisorios para cáncer de pulmón no microcítico vienen de un ensayo clínico de Fase II donde el tratamiento comprendió un

anticuerpo monoclonal (SGN-15; dox-BR96, anti-Sialyl-LeX) conjugado a un fármaco aniquilador de células doxorubicina en combinación con el agente quimioterapéutico TAXOTERE^{MR}. El TAXOTERE^{MR} es la única quimioterapia aprobada por la FDA para el tratamiento de segunda línea de cáncer de pulmón. Los datos iniciales indican una supervivencia total mejorada en comparación a TAXOTERE^{MR} solo. De entre los 62 pacientes quienes se reclutaron para el estudio, dos tercios recibieron SGN-15 en combinación con TAXOTERE^{MR} en tanto que el tercio restante recibió TAXOTERE^{MR} solo. Para los pacientes que reciben SGN-15 en combinación con TAXOTERE^{MR}, la supervivencia total media fue de 7.3 meses en comparación a 5.9 meses para pacientes que reciben TAXOTERE^{MR} solo. La supervivencia total a 1 año y 18 meses fue de 29 y 18 por ciento respectivamente para pacientes que reciben SNG-15 más TAXOTERE^{MR} en comparación a 24 y 8 por ciento, respectivamente, para pacientes que reciben TAXOTERE^{MR} solo. Se planean ensayos clínicos adicionales.

De forma preclínica, ha habido algún éxito limitado en el uso de anticuerpos monoclonales para melanoma. Muy pocos de estos anticuerpos han alcanzado ensayos clínicos y a la fecha ninguno se ha aprobado ni ha demostrado resultados favorables en ensayos clínicos de Fase III.

El descubrimiento de nuevos fármacos para tratar la enfermedad está impedido por la carencia de identificación de

objetivos pertinente entre los productos de 30,000 genes conocidos que pueden contribuir a la patogénesis de la enfermedad. En investigación oncológica, los objetivos potenciales de fármaco frecuentemente se seleccionan simplemente debido al hecho que se sobreexpresan en células tumorales. Los objetivos identificados de esta manera entonces se examinan para la interacción con una multitud de compuestos. En el caso de terapias potenciales de anticuerpo, estos compuestos candidatos se derivan usualmente de métodos tradicionales de generación de anticuerpos monoclonales de acuerdo a los principios fundamentales establecidos por Kohler y Milstein (1975, *Nature*, 256, 495-497, Kohler y Milstein). Se recolectan células del bazo de ratones inmunizados con antígeno (por ejemplo células enteras, fracciones celulares, antígeno purificado) y se fusionan con compañeros inmortalizados de hibridoma. Los hibridomas resultantes se examinan y seleccionan para secreción de anticuerpos que se unen más ávidamente al objetivo. Muchos anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico dirigidos contra células de cáncer, incluyendo el Herceptin^{MR} y RITUXIMAB^{MR}, se han producido utilizando estos métodos y se seleccionan en base a su afinidad. Los defectos en esta estrategia son dobles. Primero, la elección de objetivos apropiados para la unión del anticuerpo terapéutico de diagnóstico se limita por la escasez de conocimiento con respecto a los procesos

carcinogénicos específicos de tejido y los métodos simplistas resultantes, tal como selección por sobreexpresión, por los cuales se identifican estos objetivos. Segundo, no siempre pude ser el caso de la suposición que la molécula de fármaco que se une al receptor con la más alta afinidad tiene usualmente la probabilidad más alta de iniciar o inhibir una señal.

A pesar de algún progreso con el tratamiento de cáncer de mama y de colon, ha sido inadecuado, para todos los tipos de cáncer, la identificación y el desarrollo de terapias eficaces de anticuerpos, ya sea como agentes individuales y como co-tratamiento.

Patentes Anteriores:

La patente de los Estados Unidos No. 5,750,102 describe un proceso en donde se transfectan células del tumor de un paciente con genes de MHC, que se pueden clonar de células o tejido del paciente. Estas células transfectadas entonces se usan para vacunar al paciente.

La patente de los Estados Unidos No. 4,861,581 describe un proceso que comprende los pasos de obtener anticuerpos monoclonales que son específicos a un componente celular interno de células neoplásicas y normales de mamífero pero no ha componentes externos, marcando el anticuerpo monoclonal, poniendo en contacto el anticuerpo marcado con tejido de un mamífero que ha recibido terapia

para aniquilar células neoplásticas, y determinando la efectividad de la terapia al medir la unión del anticuerpo marcado al componente celular interno de las células neoplásticas degenerantes. Al prepara los anticuerpos dirigidos a antígenos intracelulares humanos, la patente reconoce que las células malignas representan, una fuente pendiente de estos antígenos.

La patente de los Estados Unidos No. 5,171,665 proporciona un nuevo anticuerpos y un método para su producción. Específicamente, la patente enseña la formación de anticuerpo monoclonal que tiene la propiedad de unirse fuertemente a un antígeno de proteína asociado con tumores humanos, por ejemplo, aquellos del colon y pulmón, en tanto que se une a celular normales a un grado mucho menor.

La patente de los Estados Unidos No. 5,484,596 proporciona un método de terapia de cáncer que comprende remover quirúrgicamente tejido tumoral de un paciente humano con cáncer, tratar el tejido tumoral para obtener células tumorales, irradiar las células tumorales para ser viables pero no tumorigénicas y usar estas células para preparar una vacuna para el paciente capaz de inhibir la recurrencia del tumor primario o en tanto que se inhibe simultáneamente la metástasis. La patente enseña el desarrollo de anticuerpos monoclonales, que son reactivos con los antígenos de superficie de las células tumorales. Como se expone en la

columna 4, renglones 45 et seq., la patente utiliza células tumorales autóctonas en el desarrollo de anticuerpos monoclonales expresan inmunoterapia específica activa en neoplasia humana.

La patente de los Estados Unidos número 5,693,763 enseña un antígeno de glicoproteína característico de carcinomas humanos y no dependiente del tejido epitelial de origen.

La patente de los Estados Unidos número 5,783,186 se refiere a anticuerpos anti-Her2, que inducen apoptosis en células que expresan Her2, líneas de células de hibridoma que producen los anticuerpos, métodos para tratar cáncer usando los anticuerpos y las composiciones farmacéuticas que incluyen estos anticuerpos.

La patente de los Estados Unidos número 5,849,876 describe nuevas líneas de células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales a antígenos de mucina purificados de fuentes de tejido tumoral y no tumoral.

La patente de los Estados Unidos número 5,869,268 se refiere a un método para generar un linfocito humano que produce un anticuerpo específico a un antígeno deseado, un método para producir un anticuerpo monoclonal, así como anticuerpos monoclonales producidos por el método. La patente se refiere de manera particular a la producción de un anticuerpo monoclonal humano anti-HD útil para la diagnosis

de tratamiento de cánceres.

La patente de los Estados Unidos número 5,869,045 se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, conjugados de anticuerpo e inmunotoxinas de cadena individual reactivas con células humanas de carcinoma. El mecanismo por el cual estos anticuerpos funcionan es 2 veces, ya que las moléculas son reactivas con los antígenos de membrana celular presentes en la superficie de carcinomas humanos, y además en que los anticuerpos tienen la capacidad para interiorizarse dentro de las células de carcinoma, subsiguiente a la unión, haciéndolos especialmente útiles para formar conjugados anticuerpo-fármaco y anticuerpo-toxina. En su forma no modificada, los anticuerpos también manifiestan propiedades citotóxicas a concentraciones específicas.

La patente de los Estados Unidos número 5,780,033 describe el uso de autoanticuerpos para terapia tumoral y profilaxis. Sin embargo, este anticuerpo es un anticuerpo antinuclear de un mamífero envejecido. En este caso, el anticuerpo se dice que es un tipo de anticuerpo natural encontrado en el sistema inmunitario. Debido a que el autoanticuerpo viene de "un mamífero envejecido", no hay requerimiento que el autoanticuerpo venga realmente del paciente que se trata. Además, la patente describe autoanticuerpos antinucleares monoclonales y naturales de un mamífero envejecido, y una línea de células de hibridoma que

produce un autoanticuerpo antinuclear monoclonal.

La patente de los Estados Unidos número 5,916,561 describe un anticuerpo específico, el VFF-18, y sus variantes dirigidas contra la variante exón v6 del gen de CD44. Este anticuerpo es una mejora con respecto al anticuerpo comparador ya que reconoce una variante v6 de CD44 humano en lugar de una variante v6 de CD44 de rata. Además, este anticuerpo describe ensayos de diagnóstico para la expresión de v6 de CD44. No hay función *in vitro* ni *in vivo* descrita para este anticuerpo.

La patente de los Estados Unidos número 5,616,468 describe un anticuerpo monoclonal, el Var3.1, formulado contra un péptido sintético que contiene una secuencia codificada por el exón 6A humano del gen de CD44. Específicamente, este anticuerpo no se une a la forma de 90 kD de CD44 humano y se distingue del anticuerpo Hermes-3. Se proporciona un método para la detección de la variante v6 de CD44, así como un método para examinar y valorar la transformación maligna en base a este antígeno. También se proporciona un método para examinar la enfermedad inflamatoria en base a la detección del antígeno en suero.

La patente de los Estados Unidos número 5,879,898 describe un anticuerpo específico que se une a un exón de 129 pb de una variante 6 de CD44 humano que produce un péptido de 43 aminoácidos. El anticuerpo monoclonal se produce por

varias líneas de células de hibridoma: MAK <CD44>M-1.1.12, MAK <CD44>M-2.42.3, MAK<CD44>M-4.3.16. El anticuerpo se genera de una proteína de fusión que contiene al menos un hexapéptido de la nueva secuencia de aminoácidos de v6 de CD44. Además, existe una descripción de un inmunoensayo para la detección de la variante de exón 6 que se puede usar como un diagnóstico de cáncer. De manera significativa, no se describe función *in vitro* ni *in vivo* de este anticuerpo.

La patente de los Estados Unidos número 5,942,417 describe un polinucleótido que codifica para un polipéptido tipo CD44, y el método para producir una proteína recombinante que usa el polinucleótido y sus variantes. Se reivindican anticuerpos a estos polipéptidos, sin embargo, no hay ejemplos específicos y no hay clones depositados que segreguen estos anticuerpos. Las transferencias Northern demuestran el surgimiento del polinucleótido en varios tipos de tejidos, pero no hay evidencia anexa que exista traducción ni expresión de este polinucleótido. Por lo tanto, no hay evidencia de que hubo anticuerpos que se van a producir del producto génico de este polinucleótido, que estos anticuerpos tendrán ya sea función *in vitro* o *in vivo*, y si serían pertinentes a la enfermedad cancerosa humana.

La patente de los Estados Unidos número 5,885,575 describe un anticuerpo que reacciona con un epítopo variante de CD44 y métodos para identificar la variante a través del

uso del anticuerpo. El polinucleótido aislado que codifica para esta variante se aisló de células de rata, y el anticuerpo, mAb1.1ASML, dirigido contra esta variante reconoce proteínas de un peso molecular de 120 kD, 150 kD, 180 kD y 200 kD. La administración del anticuerpo monoclonal 1.1ASML retrasó el crecimiento y metástasis de BSp73ASML de rata en ratas isogénicas. De manera significativa, 1.1ASML no reconoce tumores humanos como se demuestra por su carencia de reactividad a carcinoma humano de pulmón de células grandes LCLC97. Se aisló un homólogo humano de LCLC97 pero no se produjo anticuerpo equivalente que reconozca este homólogo. De esta manera, aunque se produjo un anticuerpo específico a una variante de CD44 de rata y se mostró que afecta el crecimiento y metástasis de tumores de rata, no hay evidencia del efecto de este anticuerpo contra tumores humanos. De manera más específica, los inventores señalan que este anticuerpo no reconoce cánceres humanos.

Breve Descripción de la Invención

Esta solicitud utiliza la metodología para producir anticuerpos anti-cáncer específicos del paciente, enseñados en la patente de los Estados Unidos número 6,180,357 para aislar líneas de células de hibridoma que codifican para anticuerpos monoclonales modificadores de enfermedad cancerosa. Estos anticuerpos se pueden producir específicamente para un tumor y de esta manera hacen posible

la adecuación de la terapia de cáncer. Dentro del contexto de esta solicitud, los anticuerpos anti-cáncer que tienen ya sea propiedades de aniquilación celular (citotóxicas) o de inhibición de crecimiento celular (citostática) se referirán más adelante como citotóxicos. Estos anticuerpos se pueden usar en beneficio de la clasificación en etapas y en la diagnosis de un cáncer, y se pueden usar para tratar metástasis tumorales. Estos anticuerpos también se pueden usar para la prevención de cáncer a manera de tratamiento profiláctico. Diferente de los anticuerpos generados de acuerdo a los paradigmas tradicionales de descubrimiento de fármacos, los anticuerpos generados de esta manera pueden seleccionar como objetivo moléculas y rutas no mostradas anteriormente como que son integrales al crecimiento y/o supervivencia de tejido maligno. Adicionalmente, las afinidades de unión de estos anticuerpos son adecuadas a los requerimientos para el inicio de los eventos citotóxicos que no se pueden tratar a interacciones más fuertes de afinidad. También, está dentro del alcance de esta invención conjugar modalidades quimioterapéuticas normales, por ejemplo, radionúclidos, con el CDMAB de la presente invención, enfocando de este modo el uso de estos quimioterapéuticos. El CDMAB también se puede conjugar a toxinas, porciones citotóxicas, enzimas, por ejemplo, enzimas conjugadas a biotina, citocinas, interferones, porciones a objetivo o

indicadoras a células hematogenosas, formando de este modo un conjugado de anticuerpo. El CDMAB se puede usar solo o en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos/CDMAB.

El prospecto de tratamiento anti-cáncer individualizado dará lugar a un cambio en la manera en que se maneja el paciente. Un probable escenario químico es que se obtiene una muestra de tumor en el momento de la presentación, y se deposita. De esta muestra, el tumor se tipifica de un panel de anticuerpos pre-existentes modificadores de enfermedad cancerosa. El paciente se clasificará convencionalmente en etapas pero los anticuerpos disponibles pueden ser de uso en la clasificación adicional en etapas del paciente. El paciente se puede tratar inmediatamente con los anticuerpos existentes, y se puede producir un panel de anticuerpos específicos al tumor ya sea usando los métodos resumidos en la presente o a través del uso de bibliotecas de visualización en fago en unión con los métodos de examen descritos en la presente. Todos los anticuerpos generados se adicionarán a la biblioteca de anticuerpos anti-cáncer puesto que hay una posibilidad que otros tumores puedan tener algunos de los mismos epítomos como el que se trata. Los anticuerpos producidos de acuerdo a este método pueden ser útiles para tratar enfermedad cancerosa en cualquier número de pacientes quienes tienen cánceres que se unen a estos anticuerpos.

Además de los anticuerpos anti-cáncer, el paciente puede elegir recibir las terapias actualmente recomendadas como parte de un régimen multi-modal de tratamiento. El hecho que los anticuerpos aislados mediante la presente metodología son relativamente no tóxicos a células no cancerosas permite que se usen combinaciones de anticuerpos a altas dosis, ya sea solos, o en unión con terapia convencional. El alto índice terapéutico también permitirá el re-tratamiento a una escala de tiempo breve que debe disminuir la probabilidad de emergencia de células resistentes al tratamiento.

Si el paciente es refractario al curso inicial de terapia o se desarrollan metástasis, se puede repetir para re-tratamiento el proceso para generar anticuerpos específicos al tumor. Además, los anticuerpos anti-cáncer se pueden conjugar a eritrocitos obtenidos de este paciente y re-infundar para el tratamiento de metástasis. Ha habido pocos tratamientos efectivos para cáncer metastásico y metástasis usualmente presagian un poco resultado que da por resultado muerte. Sin embargo, los cánceres metastásicos usualmente están bien vascularizados y la distribución de anticuerpos anti-cáncer con los eritrocitos puede tener el efecto de concentrar los anticuerpos en el sitio del tumor. Aún antes de la metástasis, la mayoría de las células de cáncer son dependientes de suministro sanguíneo del

hospedador para su supervivencia y un anticuerpo anti-cáncer conjugado a eritrocitos puede ser efectivo también contra tumores *in situ*. De manera alternativa, los anticuerpos se pueden conjugar a otras células hematogénicas, por ejemplo, linfocitos, macrófagos, monocitos, células aniquiladoras naturales, etc.

Hay cinco clases de anticuerpos y cada uno está asociado con una función que se confiere por su cadena pesada. En general se piensa que la aniquilación de células de cáncer por los anticuerpos desnudos se media ya sea a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Por ejemplo, los anticuerpos murinos IgM e IgG2a pueden activar el complemento humano al unir el componente C-1 del sistema de complemento, que activa de este modo la ruta clásica de activación de complemento que puede conducir a lisis tumoral. Para anticuerpos humanos, los anticuerpos más efectivos de activación de complemento en general son IgM e IgG1. Los anticuerpos murinos del isotipo IgG2a e IgG3 son efectivos en el reclutamiento de células citotóxicas que tienen receptores de Fc que conducirá a aniquilación celular por monocitos, macrófagos, granulocitos y ciertos linfocitos. Los anticuerpos humanos tanto del isotipo IgG1 como IgG3 median la ADCC.

La citotoxicidad mediada a través de la región Fc

requiere la presencia de células efectoras, sus correspondientes receptores, o proteínas, por ejemplo, células NK, células T y complemento. En la ausencia de estos mecanismos efectores, la porción Fc de un anticuerpo es inerte. La porción Fc de un anticuerpo puede conferir propiedades que afectan la farmacocinética de un anticuerpo *in vivo*, pero *in vitro* esto no es operativo.

Otro posible mecanismo de aniquilación de cáncer mediada por anticuerpo puede ser a través del uso de anticuerpos que funcionan para catalizar la hidrólisis de varios enlaces químicos en la membrana celular y sus glicoproteínas o glicolípidos asociados, llamados anticuerpos catalíticos.

Hay tres mecanismos adicionales de aniquilación de células de cáncer mediada por anticuerpo. El primero es el uso de anticuerpos como una vacuna para inducir al cuerpo a que produzca una respuesta inmunitaria contra el antígeno putativo que reside en la célula de cáncer. El segundo es el uso de anticuerpos para seleccionar como objetivo receptores de crecimiento e interferir con su función o para reducir la expresión de ese receptor de modo que se pierda de manera efectiva su función. El tercero es el efecto de estos anticuerpos en la ligación directa de las porciones de superficie celular que pueden conducir a muerte celular directa, tal como ligación de receptores de muerte tal como

TRAIL R1 o TRAIL R2, o moléculas de integrina tal como alfa V beta 3 y similares.

La utilidad clínica de un fármaco de cáncer se basa en el beneficio del fármaco bajo un perfil aceptable de riesgo hacia el paciente. En la terapia de cáncer, la supervivencia ha sido en general lo más buscado después del beneficio, sin embargo, hay varios otros beneficios bien reconocidos además de prolongar la vida. Estos otros beneficios, donde el tratamiento no afecta de manera adversa la supervivencia, incluyen paliación de síntomas, protección contra eventos adversos, prolongación en el tiempo para recurrencia o supervivencia libre de enfermedad, y prolongación en el tiempo al progreso. Estos criterios en general se aceptan y los cuerpos regulatorios tal como la Administración norteamericana de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos (F.D.A.) aprueba que producen estos beneficios (Hirschfeld et al., Critical Reviews in Oncology/Hematology 42:137-143 2002). Además de estos criterios, es bien reconocido que hay otros puntos finales que pueden presagiar estos tipos de beneficios. En parte, el proceso acelerado de aprobación otorgado por la U.S. F.D.A. reconoce que hay sustitutos que predecirán igualmente el beneficio del paciente. A partir de finales del año 2003, han habido sesenta fármacos aprobados bajo este proceso, y de éstos, cuatro han tenido éxito en la aprobación completa, es decir,

los estudios de seguimiento han demostrado beneficio directo al paciente como se predice por los puntos finales sustitutos. Un punto final importante para determinar los efectos del fármaco en tumores sólidos es la valoración de la carga tumoral al medir la respuesta al tratamiento (Therasse et al., Journal of the National Cancer Institute 92(3):205-216 2000). Los criterios clínicos (criterio de RECIST) para esta evaluación se han promulgado por Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Working Group, un grupo de expertos internacionales en cáncer. Los fármacos con un efecto demostrado en la carga tumoral, como se muestra por respuestas objetivas de acuerdo a los criterios de RECIST, en comparación al grupo de control apropiado tienden a, finalmente, producir beneficio directo al paciente. En el escenario pre-clínico, la carga tumoral en general es más directa para valorar y documentar. En esos estudios pre-clínicos se puede traducir al escenario clínico, fármacos que producen supervivencia prolongada en modelos pre-clínicos tienen la utilidad clínica anticipada más grande. Análogo a producir respuestas positivas al tratamiento clínico, los fármacos que reducen la carga tumoral en el escenario pre-clínico también pueden tener impacto directo significativo en la enfermedad. Aunque la prolongación de la supervivencia es lo más buscado después del resultado clínico del tratamiento de cáncer con fármacos, hay otros beneficios que tienen

utilidad química y es claro que la reducción de la carga tumoral, que puede correlacionar a un retraso en el progreso de la enfermedad, supervivencia extendida o ambos, también puede conducir a beneficios directos y tener impacto clínico (Eckhardt et al., Developmental Therapeutics: Successes and Failures of Clinical Trial Designs of Targeted Compounds; ASCO Educational Book, 39th Annual Meeting, 2003, páginas 209-219).

Usando sustancialmente el proceso de la patente de los Estados Unidos número 6,180,357, el anticuerpo monoclonal H460-16-2 de ratón se obtuvo después de la inmunización de ratones con células tanto una biopsia de tumor de un paciente como de una línea de células de cáncer de pulmón NCI-H460. El antígeno H460-16-2 se expresó en la superficie celular de una amplia variedad de líneas de células humanas de diferentes orígenes de tejido. La línea de células de cáncer de mama MDA-MB-231 y la línea de células de cáncer de piel A2058 fueron susceptibles a los efectos citotóxicos de H460-16-2 *in vitro*.

El resultado de la citotoxicidad de H460-16-2 contra células MDA-MB-231 en cultivo se extendió además por su actividad anti-tumor hacia estas células de cáncer cuando se trasplantaron en ratones (como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 10/603,000). Los modelos pre-clínicos de tumor de xeno-injerto se

consideran predictores válidos de eficiencia terapéutica.

En el modelo *in vivo* preventivo de cáncer de mama humano, el tratamiento con H460-16-2 fue significativamente ($p < 0.0001$) más efectivo en suprimir el crecimiento tumoral durante el periodo de tratamiento que un anticuerpo de control de isotipo. Al final de la fase de tratamiento, los ratones a los que se les dio H460-16-2 tuvieron tumores que crecieron sólo 1.3 por ciento del grupo de control. Durante el periodo de seguimiento después del tratamiento, se sostuvieron los efectos del tratamiento de H460-16-2 y el volumen tumoral medio en los grupos tratados continuó siendo significativamente menor que los controles hasta el final de la fase de medición. Usando la supervivencia como una medida de la eficiencia del anticuerpo, se estimó que el riesgo de morir en el grupo de tratamiento con H460-16-2 fue aproximadamente 71 por ciento del grupo de control de amortiguador de anticuerpo ($p = 0.028$) a 70 días después del tratamiento. Estos datos demostraron que el tratamiento con H460-16-2 confirió un beneficio de supervivencia en comparación a los grupos tratados con control. El tratamiento con H460-16-2 pareció seguro, puesto que no induce ningún signo de toxicidad, incluyendo peso corporal reducido y estrés clínico. De esta manera, el tratamiento con H460-16-2 fue eficaz tanto en retrasar el crecimiento tumoral como en mejorar la supervivencia en comparación a los

grupos tratados de control en un modelo bien establecido de cáncer humano de mama.

Además, el H460-16-2 demostró actividad anti-tumor contra células MDA-MB-231 en un modelo establecido de tumor *in vivo* (como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 10/603,000). El tratamiento con H460-16-2 se comparó al fármaco quimioterapéutico estándar, cisplatina, y se mostró que los grupos de tratamiento con cisplatina y H460-16-2 tuvieron significativamente ($p < 0.001$) menores volúmenes tumorales medios en comparación con los grupos tratados con ya sea amortiguador dilución anticuerpo o el anticuerpo de control de isotipo. El tratamiento con H460-16-2 medió la supresión tumoral que fue aproximadamente dos tercios de aquella en la quimioterapia con cisplatina pero sin la pérdida significativa de peso (19.2 por ciento) ($p < 0.003$) y estrés clínico, incluyendo 2 muertes asociadas al tratamiento, que se observó con el tratamiento de cisplatina. La actividad anti-tumor de H460-16-2 y su mínima toxicidad lo hace un agente terapéutico anti-cáncer atractivo.

Además, en el periodo de post-tratamiento, el H460-16-2 mostró un beneficio significativo de supervivencia ($p < 0.02$) puesto que el riesgo de muerte en el grupo de H460-16-2 fue de aproximadamente la mitad de aquel en el grupo del cuerpo de control con isotipo a >70 días después del

tratamiento. El beneficio observado de supervivencia continuó más allá de los 120 días después del tratamiento donde 100 por ciento de los ratones tratados con cisplatina y de control de isotipo han muerto en comparación a 67 por ciento del grupo de tratamiento con H460-16-2. El H460-16-2 mantuvo supresión tumoral al retrasar el crecimiento del tumor por el 26 por ciento en comparación al grupo de anticuerpo de control isotipo. A los 31 días después del tratamiento, el H460-16-2 limitó el tamaño del tumor al reducir el crecimiento tumoral por 48 por ciento en comparación al grupo de control de isotipo, que es comparable a la reducción del 49 por ciento observada al final del tratamiento. En el modelo establecido de tumor de cáncer de mama, estos resultados indicaron el potencial de H460-16-2 para mantener la supresión tumoral más allá de la fase del tratamiento y demostró la capacidad del anticuerpo para reducir la carga tumoral y para mejorar la supervivencia en un mamífero.

Además de los efectos benéficos en el modelo tumoral *in vivo* establecido de cáncer de mama, el tratamiento con H460-16-2 en combinación con un fármaco quimioterapéutico (Cisplatina) tiene actividad anti-tumor contra células PC-3 en un modelo establecido de cáncer de próstata *in vivo* (como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número 10/810,165). Usando una prueba t apareada, el

tratamiento con H460-16-2 más cisplatina fue significativamente más efectivo en suprimir brevemente el crecimiento tumoral después del periodo de tratamiento de control con amortiguador ($p < 0.0001$), el tratamiento con cisplatina sola ($p = 0.004$) o el tratamiento con H460-16-2 sólo ($p < 0.0001$). Al final de la fase de tratamiento, los ratones a los que se les dio H460-16-2 más cisplatina tuvieron tumores que crecieron sólo a 28.5 por ciento del grupo de control de amortiguador. Para los modelos xeno-injerto de PC-3 SCID, se puede usar el peso corporal como un indicador sustituto del progreso de la enfermedad. Los ratones en todos los grupos experimentaron severa pérdida de peso. En este estudio, los ratones en todos los grupos mostraron una pérdida de peso de aproximadamente 23 a 35 por ciento por el final del periodo de tratamiento. El grupo tratado con H460-16-2 mostró el lado más pequeño de pérdida de peso (21.7 por ciento). Después del tratamiento, día 48, no hubo incremento significativo en la pérdida de peso asociada con el tratamiento de H460-16-2 y cisplatina en comparación al control con amortiguador ($p = 0.5042$). De esta manera, el tratamiento con H460-16-2 más cisplatina fue eficaz puesto que retrasó el crecimiento tumoral en comparación al grupo tratado con control de isotipo en un modelo bien establecido de cáncer humano de próstata.

A fin de validar el epítipo de H460-16-2 como un

objetivo del fármaco, se determinó anteriormente (solicitud de patente de los Estados Unidos número 10/603,000), la expresión del antígeno H460-16-2 en tejidos humanos normales. Este trabajo se extendió por comparación con los anticuerpos anti-CD44; clon L178 (descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos número 10/647,818, ahora patente de los Estados Unidos número 7,189,397) y el clon BU75 (descrito en la solicitud de patente de los Estados Unidos número 10/810,165). Por la tinción de IHC con H460-16-2, la mayoría de los tejidos falló en expresar el antígeno de H460-16-2, incluyendo las células de los órganos vitales, tal como el hígado, riñón (excepto por la tinción marginal de células epiteliales tubulares), corazón y pulmón. Los resultados de esta tinción de tejido indicaron que H460-16-2 mostró unión restringida a varios tipos celulares pero tuvo unión a macrófagos infiltrantes, linfocitos y fibroblastos. El anticuerpo BU75 mostró un patrón similar de tinción. Sin embargo, hubo al menos una diferencia de nota; la tinción de linfocitos fue más intensa con BU75 en comparación H460-16-2.

La localización del antígeno H460-16-2 y la determinación de su prevalencia dentro de la población, tal como entre los pacientes con cáncer de mama, es importante al valorar el uso terapéutico de H460-16-2 y en el diseño de ensayos clínicos efectivos. Para afrontar la expresión del antígeno H460-16-2 en tumores de mama de pacientes con

cáncer, se examinaron en forma previa muestras de tejido tumoral de 50 pacientes individuales con cáncer de mama para la expresión del antígeno H460-16-2 (solicitud de patente de los Estados Unidos número 10/603,000) y se comparó a L178 (solicitud de patente de los Estados Unidos número 10/647,818, ahora patente de los Estados Unidos número 7,189,397), BU75 (solicitud de patente de los Estados Unidos número 10/810,165) y el anticuerpo anti-Her2 c-erbN-2 (solicitud de patente de los Estados Unidos número 10/810,165). Los resultados de estos estudios fueron similares y mostraron que 62 por ciento de las muestras de tejido tiñeron positivas para el antígeno H460-16-2 en tanto que 73 por ciento de los tejidos de tumor de mama fueron positivos para el epítipo de BU75. La expresión de H460-16-2 dentro de muestras de pacientes parecieron específicos para células de cáncer puesto que la tinción se restringió a células malignas. El H460-16-2 tiñó 4 de 10 muestras de tejido normal de pacientes con cáncer de mama en tanto que BU75 tiñó 8. La expresión del tumor de mama tanto del antígeno H460-16-2 y BU75 pareció estar localizada principalmente en la membrana celular de células malignas, haciendo a CD44 un objetivo atractivo para terapia. La expresión de H460-16-2 se evaluó adicionalmente en base a la expresión del tumor de mama de los receptores para las hormonas de estrógeno y progesterona, que juegan un papel importante en el desarrollo, tratamiento y la prognosis

de tumores de mama. No fue aparente correlación entre la expresión del antígeno H460-16-2 y la expresión de los receptores para ya sea estrógeno o progesterona. Cuando se analizaron tumores en base a su etapa, o grado al cual ha avanzado el cáncer, nuevamente no hubo correlación clara entre la expresión del antígeno H460-16-2 y la etapa del tumor. Se obtuvieron resultados similares con BU75. En comparación a c-erbN-2, el H460-16-2 mostró un perfil de tinción completamente diferente donde 52 por ciento de las muestras de tejido del tumor de mama que fueron positivas para el antígeno H460-16-2 fueron negativas para la expresión de Her-2 indicando una necesidad terapéutica buscada aún no satisfecha para pacientes con cáncer de mama. También hubo diferencias en la intensidad de la tinción entre las secciones de tejido de tumor de mama que fueron positivas tanto para H460-16-2 como para Her2. El anticuerpo c-erbB-2 también tiñó positivamente una de las secciones normales de tejido de mama.

La localización adicional del antígeno H460-16-2 y la determinación de su prevalencia dentro de la población, tal como entre pacientes con cáncer de próstata, se describió en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 11/364,013. La unión de anticuerpos a 53 tumores humanos de próstata y tres tejidos normales de próstata se realizó usando un microarreglo de tejido normal y tumoral de

próstata humana (Imgenex, San Diego, CA). Como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 11/364,013, 19/53 (36 por ciento) de los tumores probados fueron positivos para H460-16-2. El H460-16-2 fue específico para células tumorales y fibroblastos de estroma. La localización celular fue principalmente membranosa y membranosa citoplásmica con o sin localización luminal. El porcentaje de células positivas varió desde <10 por ciento- >50 por ciento que indica unión heterogénea del anticuerpo a células tumorales. La relación del anticuerpo que se une a la etapa tumoral no se puede valorar apropiadamente debido a una discrepancia en el número de tumores entre diferentes estados tumorales, siendo 1/1 (100 por ciento), 4/12 (33 por ciento), 0/2 (0 por ciento) y 11/33 (33 por ciento) a la etapa tumoral I, II, III y IV, respectivamente. Hubo mayor unión a la puntuación Gleason G3-G4 (36 por ciento) que a la G1-G2 (25 por ciento). Las 3 secciones de tejido normal de próstata fueron positivas para el anticuerpo. Sin embargo, la especificidad de tejido fue para el mioepitelio y fibroblastos estromales y escaso para el epitelio glandular. Hubo heterogeneidad de la unión de H460-16-2 a los tumores probados de próstata: 10/53, 6/53, 3/53 tumores positivos estuvieron en las categorías de <10-10 por ciento, <50-50 por ciento y >50 por ciento, respectivamente. Como resultado de su unión a células de cáncer de próstata, el beneficio

terapéutico de H460-16-2 se puede extender potencialmente al tratamiento de cáncer de próstata.

La localización adicional del antígeno H460-16-2 y la determinación de su prevalencia dentro de la población, tal como entre los pacientes con cáncer de hígado, se describió en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 11/364,013. El anticuerpo H460-16-2 mostró unión a 21/49 (43 por ciento) de cánceres hepáticos probados, incluyendo 11/37 (30 por ciento) de primario, 7/8 (88 por ciento) de carcinoma hepatocelular metastásico, 1/2 (50 por ciento) de primario y 2/2 (100 por ciento) de colangiocarcinomas metastásicos. El anticuerpo mostró una unión significativamente mayor a etapas tumorales avanzadas III y IV en comparación con las etapas tempranas I y II ($p = 0.03$) [etapa I, 0/2 (0 por ciento); etapa II, 2/17 (12 por ciento), etapa III, 8/16 (50 por ciento) y etapa IV, 6/8 (75 por ciento)]. El H460-16-2 fue específico para células tumorales y células inflamatorias infiltrantes. La localización celular fue principalmente membranosa. Algunos tumores también exhibieron un patrón difuso de tinción citoplásmica. El anticuerpo se unió a 9/9 de tejidos hepáticos no neoplásicos. Sin embargo, la unión se restringió a las células sinusoidales y linfocitos infiltrantes. El antígeno H460-16-2 parece ser expresado específicamente en tejido tumoral hepático avanzado. Por lo

tanto, el H460-16-2 tiene potencial como un fármaco terapéutico en el tratamiento de cáncer hepático.

Para prolongar adicionalmente el beneficio terapéutico potencial de H460-16-2, la frecuencia y localización del antígeno dentro de varios tejidos de cáncer humano también se determinó anteriormente (solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 10/603,000) y se comparó al clon L178 (solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 10/647,818, ahora patente de los Estados Unidos número 7,189,397). La mayoría de estos tipos de tumor también fue positivo para el antígeno L178. Como con el tejido de tumor de mama humano, la localización de H460-16-2 y L178 ocurrió en la membrana de las células tumorales. Sin embargo, hubo sustancialmente más localización de membrana con el L178 en comparación al anticuerpo H460-16-2. También, de los tipos de tumor que se tiñeron tanto por H460-16-2 como por L178, el 43 por ciento de los tejidos mostró mayor intensidad de tinción con el anticuerpo L178.

Parece no haber forma de CD44 que corresponde exactamente con los datos de IHC presentados en la presente en base a comparaciones con los datos de IHC de la literatura. La forma estándar de CD44 normalmente se expresa en el cerebro humano; no lo hace el antígeno H460-16-2. Los anticuerpos dirigidos contra las isoformas pan-CD44 no tiñen el hígado (incluyendo células de Kupffer) y tiñen

positivamente las glándulas endometriales en todas las fases del ciclo reproductivo. El antígeno H460-16-2 está claramente presente en las células de Kupffer y sólo está presente en las glándulas endometriales secretorias del ciclo reproductivo. El antígeno H460-16-2 está claramente presente en macrófagos de tejido y sólo las formas variantes V4/5 y V8/9 muestran tinción ocasional de macrófagos. El patrón similar de unión aún distinta visto con H460-16-2 en comparación al L178 anti-CD44 y ahora BU75 indica que el antígeno H460-16-2 es un epítipo único de CD44.

Como se describe anteriormente (solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 10/647,818, ahora patente de los Estados Unidos número 7,189,397), los datos bioquímicos adicionales también indican que el antígeno reconocido por H460-16-2 es una de las formas de CD44. Esto se soporta por estudios que mostraron un anticuerpo monoclonal (L178) reactivo contra CD44 identifica proteínas que se unieron a H460-16-2 por inmunoprecipitación. Los estudios de transferencia Western también sugieren que el epítipo de CD44 reconocido por H460-16-2 no está presente en v6 o v10. El epítipo de H460-16-2 también se distingue por ser dependiente de carbohidratos y de la conformación, en tanto que muchos anticuerpos anti-CD44 se dirigen contra porciones peptídicas de CD44. Estos resultados bioquímicos y de IHC demuestran que H460-16-2 se une a una variante del

antígeno CD44. De esta manera, la preponderancia de evidencia muestra que H460-16-2 media los efectos anti-cáncer a través de la ligación de un epítipo conformacional único dependiente de carbohidratos presente en una variante de CD44. Para el propósito de esta invención, este epítipo se define como una "porción antigénica de CD44" caracterizada por su capacidad para unirse con un anticuerpo monoclonal codificado por la línea de células de hibridoma H460-16-2, fragmentos antigénicos de unión de la misma, ligandos antigénicos de unión de la misma o conjugados de anticuerpo de la misma.

A fin de poner en claro de forma adicional el mecanismo detrás de los efectos anti-cáncer de H460-16-2, se realizaron ensayos de unión con ácido hialurónico (HA) (como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 10/810,165). Se determinó que se requirió una concentración promedio de 1.87 (+/- 1.01) microgramos/mL de H460-16-2 para inhibir la adhesión de células MDA-MB-231 al HA por 50 por ciento. Estos resultados indican que H460-16-2 interactúa con, al menos en parte, las regiones en CD44 que son responsables para la unión a HA y en consecuencia pueden estar mediando sus efectos anti-cáncer a través de la regulación de la expresión del angiogénesis o la invasión tumoral a través de la ECM.

Además de los ensayos de unión con HA, se realizó

un experimento del ciclo celular a fin de determinar si los efectos anti-cáncer *in vitro* e *in vivo* de H460-16-2 fueron debidos a la regulación del ciclo celular (como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 10/810,165). Después de 24 horas y con 20 microgramos/mL de H460-16-2, hubo un incremento en el número de células apoptósicas MDA-MB-231 en comparación al control con isotipo. Este efecto también pareció ser dependiente de la dosis. Por lo tanto, la eficiencia de H460-16-2 también puede ser debida, en totalidad o en parte, a sus capacidades inductoras apoptósicas.

Para poner en claro adicionalmente el mecanismo de acción de H460-16-2, se realizó el efecto del tratamiento con H460-16-2 en la apoptosis en tumores MDA-MB-231 cultivados *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama (como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 11/364,013). Las secciones seriales de los tumores teñidos con ApoTag se tiñeron subsiguientemente con H & E y éstas se examinaron para células apoptósicas usando criterios morfológicos tal como supresión de células individuales, encogimiento y compactación celular de cromatina en una masa densa. Se realizaron cuentas para células que cumplen con estos criterios como se describe en la sección anterior para dar cuentas promedio para los grupos de tratamiento. El grupo de control con amortiguador produjo

una puntuación total promedio de 17 células (± 5.29) en tanto que el grupo tratado con H460-16-2 produjo una puntuación total promedio de 22.5 células (± 4.20). Por lo tanto, hay una tendencia hacia apoptosis incrementada con el tratamiento con H460-16-2 como se determina usando morfología celular.

A fin de facilitar la producción de quimeras de anticuerpo, se clonaron de manera separada y se secuenciaron los genes que codifican para las regiones variables tanto de las cadenas pesadas como ligeras (como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 11/364,013). Las cadenas ligera y pesada híbridas de H460-16-2 de un isotipo IgG1 e IgG2 humano entonces se construyeron y expresaron (como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 11/364,013).

Para determinar la eficiencia relativa del anticuerpo híbrido versus murino, se realizó un modelo *in vivo* de cáncer de mama humano (como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 11/364,013). Tanto el H460-16-2 como (ch)ARH460-16-2-IgG1 redujeron el crecimiento tumoral en un modelo establecido *in vivo* de MDA-MB-231 de cáncer humano de mama. En el día 62, 5 días después de que se administró la última dosis, el tratamiento con H460-16-2 dio por resultado una inhibición de crecimiento tumoral de 39 por ciento (T/C media = 57 por ciento). Esta reducción en el crecimiento tumoral fue

significativamente diferente del control ($p = 0.0037$). El anticuerpo híbrido (ch)ARH460-16-2-IgG1 dio por resultado una inhibición mejorada de crecimiento tumoral de 64 por ciento ($T/C = \text{media} = 26.9$ por ciento; $p < 0.0001$). En contraste, la versión de IgG2 del anticuerpo híbrido, (ch)ARH460-16-2-IgG2 no mostró inhibición en el crecimiento tumoral en comparación con el control con amortiguador (inhibición de crecimiento tumoral = 0 por ciento; $T/C \text{ media} = 122$ por ciento; $p = 0.7264$). No hubo signos clínicos de toxicidad a todo lo largo del estudio. En resumen, (ch)ARH460-16-2-IgG1 demuestra la misma o mayor eficiencia en comparación al anticuerpo murino en el modelo de cáncer de mama de MDA-MB-231.

La tinción con Anexina-V se realizó de forma previa (como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 11/364,013) para determinar si las versiones híbridas de H460-16-2 fueron capaces de inducir apoptosis de la misma manera como la contraparte murina en la línea de células de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Los 3 anticuerpos mostraron un incremento dependiente de la dosis en el porcentaje de poblaciones necróticas y necróticas/apoptóticas con respecto a sus controles de isotipo prospectivos. El incremento más grande en el porcentaje de poblaciones necróticas y necróticas/apoptóticas se vio con (ch)ARH460-16-2-IgG2, tanto (ch)ARH460-16-2-IgG1 y

tanto H460-16-2.

In toto, estos datos demuestran que el antígeno H460-16-2 es un antígeno asociado a cáncer y se expresa en humanos, y es un objetivo de cáncer patológicamente pertinente. Adicionalmente, estos datos también demuestran la unión del anticuerpo H460-16-2 a tejidos humanos de cáncer, y se puede usar apropiadamente para ensayos que pueden ser de diagnóstico, predictivos de terapia, o de pronóstico. Además, la localización de membrana celular de este antígeno es indicativa del estado del cáncer de la célula debido a la carencia de expresión del antígeno en la mayoría de las células no malignas, y esta observación permite el uso de este antígeno, su gen o sus derivados, su proteína o sus variantes que se van a usar para ensayos que pueden ser de diagnóstico, predictivos de terapia, o de pronóstico.

Otros estudios, que comprenden el uso de anticuerpos anti-CD44, tienen limitaciones de potencial terapéutico que no se exhiben por H460-16-2. El H460-16-2 demuestra tanto actividad antitumoral *in vitro* como *in vivo*. Los anticuerpos descritos anteriormente tal como MAK<CD44>M-1.1.12, MAK <CD44>M-2.42.3 y MAK<CD44>M-4.3.16 no tienen citotoxicidad *in vitro* o *in vivo* atribuida a ellos y VFF-18 y Mab U36 no muestran citotoxicidad tumoral intrínseca. Además de los anticuerpos anti-CD44 que han mostrado efectos

tumorales *in vivo* también tienen ciertas limitaciones que no son evidentes con H460-16-2. Por ejemplo, ASML1.1, K926, anti-CD44 e IM-78.1 muestran actividad anti-tumor *in vivo* contra tumores de rata, murinos, de rata y murinos cultivados respectivamente en modelos de xenoinjerto. El H460-16-2 demuestra la actividad anti-tumor en un modelo de cáncer humano. El H460-16-2 también se dirige contra CD44 humano en tanto que los anticuerpos tal como ASML1.1 reconocen sólo CD44 de rata. El anticuerpo anti-CD44 del clon 515 inhibe implante tumoral peritoneal de una línea de células de ovario humano pero no impide ni inhibe el crecimiento tumoral. El H460-16-2 es capaz de inhibir el crecimiento de tumor de mama humano en un modelo de xenoinjerto de ratón SCID. El GKW.A3 es un anticuerpo monoclonal anti-CD44 humano capaz de inhibir el crecimiento tumoral de un melanoma metastatizante humano cultivado en ratones en un modelo preventivo pero no establecido. El H460-16-2 ha demostrado actividad anti-tumor significativa tanto en modelos preventivos como establecidos de xenoinjerto murino de cáncer humano de mama. En consecuencia, es bastante evidente que H460-16-2 tiene propiedades anti-tumor superiores en comparación a los anticuerpos anti-CD44 anteriormente descritos. Ha demostrado tanto actividad anti-tumor *in vivo* como *in vitro* en un tumor de mama humano en ratones SCID y se dirige contra CD44 humano. También exhibe actividad en un modelo preventivo y

establecido (más clínicamente pertinente) de cáncer humano de mama y exhibe actividad con Cisplatina en un modelo establecido de cáncer humano de próstata.

La presente invención describe el desarrollo y el uso de H460-16-2, sus anticuerpos quiméricos correspondientes, (ch)ARH460-16-2-IgG1 y (ch)ARH460-16-2 (VK0VH0), y sus variantes correspondientes de anticuerpo humanizado, (hu)ARH460-16-2. El H460-16-2 se identificó por, su efecto, en ensayos citotóxicos, en modelos de crecimiento tumoral y en la prolongación del tiempo de supervivencia en mamíferos que padecen de tejido canceroso. Esta invención representa un avance en el campo del tratamiento de cáncer ya que describe, por primera vez, reactivos que se unen de manera específica a un epítipo o epítipos presentes en la molécula objetivo, CD44, y que también tiene propiedades citotóxicas *in vitro*, como un anticuerpo desnudo, contra células tumorales malignas pero no contra células normales, que también media directamente, como un anticuerpo desnudo, la inhibición del crecimiento tumoral y la extensión de la supervivencia en modelos *in vivo* de cáncer humano. Esto es un avance con relación a cualquier otro anticuerpo anti-CD44 anteriormente descrito, puesto que ninguno se ha mostrado que tiene propiedades similares. También proporciona un avance en el campo puesto que demuestra claramente, y por primera vez, la implicación directa de CD44 en eventos asociados con

el crecimiento y desarrollo de ciertos tipos de tumores. También representa un avance en la terapia de cáncer puesto que tiene el potencial de presentar propiedades anti-cáncer similares en pacientes humanos. Un avance adicional es que la inclusión de estos anticuerpos en una biblioteca de anticuerpos anti-cáncer mejora la posibilidad de seleccionar como objetivo tumores que expresan diferentes marcadores de antígeno por la determinación de la combinación apropiada de diferentes anticuerpos anti-cáncer, para encontrar lo más efectivo en la selección de objetivo y la inhibición del crecimiento y desarrollo de los tumores.

Ante todo, esta invención enseña el uso del antígeno H460-16-2 como un objetivo para un agente terapéutico, que cuando se administra puede producir la carga tumoral de un cáncer que expresa el antígeno de un mamífero, y también puede conducir a una supervivencia prolongada del mamífero tratado. Esta invención también enseña el uso de CDMAB (H460-16-2, (ch)ARH460-16-2-IgG1, (ch)ARH460-16-2 (VK0VH0) y las variantes de (hu) ARH460-16-2), y sus derivados, y los fragmentos de unión a antígeno del mismo, y ligandos inductores de citotoxicidad celular del mismo para seleccionar como objetivo su antígeno para reducir la carga tumoral de un cáncer que expresa el antígeno en un mamífero, y conducir a supervivencia prolongada del mamífero tratado. Adicionalmente, esta invención también enseña el uso de la

detección del antígeno H460-16-2 en células cancerosas que puede ser útil para la diagnosis, predicción de terapia, y prognosis de mamíferos que tienen tumores que expresan este antígeno.

Por consiguiente, es un objeto de la invención utilizar un método para producir anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa (CDMAB) formulados contra células cancerosas derivadas de un individuo particular, o una o más líneas particulares de células de cáncer, CDMAB que son citotóxicos con respecto a las células de cáncer en tanto que simultáneamente son relativamente no tóxicos a células no cancerosas, a fin de aislar las líneas de células de hibridoma y los correspondientes anticuerpos monoclonales aislados y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos para los cuales se codifican estas líneas de células de hibridoma.

Es un objetivo adicional de la invención enseñar anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa, ligandos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Es un objetivo adicional de la presente invención producir anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa cuya citotoxicidad se media a través de la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Es aún un objetivo adicional de la presente invención producir anticuerpos modificadores de enfermedad

cancerosa cuya citotoxicidad se media a través de la toxicidad celular dependiente de complemento.

Es aún un objetivo adicional de la presente invención producir anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa cuya citotoxicidad es una función de su capacidad para catalizar la hidrólisis de enlaces químicos celulares.

Un objetivo aún adicional de la presente invención es producir anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa que son útiles en un ensayo de unión para la diagnosis, prognosis y monitoreo de cáncer.

Otros objetos y ventajas de esta invención llegarán a ser evidentes a partir de la siguiente descripción en donde se exponen, a manera de ilustración y de ejemplo, ciertas modalidades de esta invención.

Breve Descripción de las Figuras

El registro de la patente o solicitud contiene al menos una figura realizada en color. Las copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con figuras a color se proporcionarán por la oficina a petición y pago de la tasa necesaria.

La Figura 1 demuestra el efecto de H460-16-2 en el crecimiento tumoral en un modelo establecido de cáncer de mama humano MDA-MB-468. Las líneas punteadas verticales indican el periodo durante el cual se administró intraperitonealmente el anticuerpo. Los puntos de datos

representan la media $\pm$ SEM.

La Figura 2 demuestra el efecto de H460-16-2 en el peso corporal del ratón en un modelo establecido de cáncer de mama MDA-MB-468. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

La Figura 3 demuestra el efecto de H460-16-2 en el crecimiento tumoral en un modelo establecido de cáncer de próstata humano PC-3. Las líneas punteadas verticales indican el periodo durante el cual se administró intraperitonealmente el anticuerpo. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

La Figura 4 demuestra el efecto de H460-16-2 en el peso corporal de ratón en un modelo establecido de cáncer de próstata PC-3. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

La Figura 5 demuestra el efecto de (ch)ARH460-16-2-IgG1 de una manera dependiente de la dosis en el crecimiento tumoral en un modelo establecido de cáncer de mama humano (MDA-MB-231). Las líneas punteadas verticales indican el periodo durante el cual se administró intraperitonealmente el anticuerpo. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

La Figura 6 demuestra el efecto de (ch)ARH460-16-2-IgG1 en el peso corporal de ratón en un modelo establecido de cáncer de mama MDA-MB-231. Los puntos de datos representan

la media +/- SEM.

La Figura 7 es un resumen de la unión de H460-16-2 en un microarreglo de tejido tumoral de colon humano.

La Figura 8 son micrografías representativas que muestran el patrón de unión en el tejido de tumor de colon obtenido con H460-16-2 (A) o el anticuerpo (B) de control de isotipo. El aumento es de 200X.

La Figura 9 es un resumen de la unión de (ch)ARH460-16-2-IgG1 en un microarreglo de tejido de mono cynomolgus y humano.

La Figura 10 muestran micrografías representativas que muestran el patrón de unión con (ch)ARH460-16-2-IgG1 en un bazo humano (pulpa blanca) (A) y bazo de mono cynomolgus (pulpa blanca) (B). Se observó tinción con ambas especies. El aumento es de 40X.

La Figura 11 muestran la transferencia Western de 500 microgramos de proteínas de membrana MDA-MB-231 sondeadas con diferentes soluciones de anticuerpo primario. Las sendas 1-5 se sondearon con H460-16-2 biotinilado mezclado con 2 microgramos/mL, 10 microgramos/mL, 100 microgramos/mL, 500 microgramos/mL o 1000 microgramos/mL de H460-16-2 no biotinilado, respectivamente. Las sendas 6-10 se sondearon con H460-16-2 biotinilado mezclado con 2 microgramos/mL, 10 microgramos/mL, 100 microgramos/mL, 500 microgramos/mL o 1000 microgramos/mL de AR37A335.8 no

biotinilado, respectivamente. Las sendas 11-15 se sondearon con H460-16-2 biotinilado, mezclado con 2 microgramos/mL, 10 microgramos/mL, 100 microgramos/mL, 500 microgramos/mL o 1000 microgramos/mL de IB7.11 no biotinilado, respectivamente.

La Figura 12 muestran la transferencia Western de 500 microgramos de las proteínas de membrana MDA-MB-231 sondeadas con diferentes soluciones de anticuerpo primario. Las sendas 1-5 se sondearon con AR37A335.8 biotinilado mezclado con 2 microgramos/mL, 10 microgramos/mL, 100 microgramos/mL, 500 microgramos/mL o 1000 microgramos/mL de H460-16-2 no biotinilado, respectivamente. Las sendas 6-10 se sondearon con AR37A335.8 biotinilado mezclado con 2 microgramos/mL, 10 microgramos/mL, 100 microgramos/mL, 500 microgramos/mL o 1000 microgramos/mL de AR37A335.8 no biotinilado, respectivamente. Las sendas 11-15 se sondearon con AR37A335.8 biotinilado, mezclado con 2 microgramos/mL, 10 microgramos/mL, 100 microgramos/mL, 500 microgramos/mL o 1000 microgramos/mL de 8B1B.1 no biotinilado, respectivamente.

La Figura 13 muestra la afinidad de unión de AR37A335.8. Las constantes de disociación para la unión de los anticuerpos al CD44 humano recombinante purificado se valoraron por resonancia de plasmón superficial.

La Figura 14 muestra la lista de RTK cuya fosforilación se afecta por el tratamiento de células MDA-MB-231 con (ch)ARH460-16-2-IgG1 seguido por suero y estimulación

con complemento.

La Figura 15 muestra los cebadores usados en la amplificación por PCR de la cadena ligera (SEQ ID NOS: 10-28, respectivamente, en orden de aparición).

La Figura 16 muestra los cebadores usados en la amplificación por PCR de la cadena pesada (SEQ ID NOS: 29-44, respectivamente, en orden de aparición).

La Figura 17 muestra la Secuencia VH de H460-16-2 de ratón (SEQ ID NO: 45).

La Figura 18 muestra la Secuencia VL de H460-16-2 de ratón (SEQ ID NO: 46).

La Figura 19 muestra los oligonucleótidos (SEQ ID NOS: 47-58, respectivamente, en el orden de aparición) usados para la generación de secuencias VH de H460-16-2 híbridas y humanizadas variantes.

La Figura 20 muestra los oligonucleótidos (SEQ ID NOS: 59-68, respectivamente, en el orden de aparición) usados para la generación de secuencias VL de H460-16-2 humanizadas variantes y híbridas.

La Figura 21 muestra el vector de expresión pANT18.

La Figura 22 muestra las variantes de VH de H460-16-2 humanizadas (SEQ ID NOS: 7 y 9, respectivamente, en el orden de aparición). Se subrayan las CDR.

La Figura 23 muestra las variantes de VL de H460-16-2 humanizadas (SEQ ID NO: 8). Se subrayan las CDR.

La Figura 24 muestra los datos de unión para las variantes híbridas y humanizadas de H460-16-2.

La Figura 25 muestra la afinidad de unión de H460-16-2 murino, y de las variantes humanizadas, (hu)ARH460-16-2, variante HV1/KV1 y (hu)ARH460-16-2, variante HV2/KV1. Las constantes de disociación para la unión de los anticuerpos al CD44 humano recombinante purificados se valoran por resonancia de plasmón superficial.

Descripción Detallada de la Invención

En general, las siguientes palabras o frases tienen la definición indicada cuando se usan en el resumen, en la descripción, en los ejemplos y en las reivindicaciones.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes, anticuerpos desinmunizados, murinos, quiméricos o humanizados), composiciones de anticuerpo con especificidad poliepitópica, anticuerpos de cadena individual, diacuerpos, triacuerpos, inmunoconjugados y fragmentos de anticuerpo (ver más adelante).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido en una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos monoclonales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones

que se presentan de manera natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, que se dirigen contra un sitio antigénico individual. Además, en contraste a las preparaciones de anticuerpo policlonal que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante individual en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que se pueden sintetizar de manera no contaminada con otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se va a considerar como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden producir por el método de hibridoma (murino o humano) descrito primero por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975), o se pueden producir por métodos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos número 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpo de fago usando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), a manera de ejemplo.

"Fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende de manera preferente la región variable o de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen menos que anticuerpos de longitud completa, fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena individual; anticuerpos de cadena individual, moléculas de anticuerpo de dominio individual, proteínas de fusión, proteínas recombinantes y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpo.

Un anticuerpo "intacto" es un uno que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante (C_L) de cadena ligera y dominios constantes, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Los dominios constantes pueden ser de dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. De manera preferente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de dominio constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos se pueden asignar a diferentes "clásico". Hay cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, y IgA2. Los dominios constantes de

cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos se llaman α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Son bien conocidas las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas.

Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Los ejemplos de las funciones efectoras del anticuerpo incluyen unión a Clq; citotoxicidad dependiente de complemento; unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; reducción de la expresión de receptores de superficie celular (por ejemplo receptor de células B; BCR), etc.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la cual las células citotóxicas no específicas que expresan los receptores Fc (FcR) (por ejemplo células Aniquiladoras Naturales (NK, por sus siglas en inglés), neutrófilos, y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido en una célula objetivo y provocan de manera subsiguiente lisis de la célula objetivo. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan sólo Fc γ RIII, en tanto que los monocitos expresan Fc ν RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de

FcR en células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para valorar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como aquel descrito en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,500,362 o 5,821,337 las células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y célula Aniquiladoras Naturales (NK). De manera alternativa, o adicionalmente, se puede valorar *in vivo* la actividad de de ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo de animal tal como aquel descrito en Clynes y colaboradores *PNAS* (EUA) 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. De manera preferente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen célula mononucleares de sangre periférica (PBMC), células aniquiladoras naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; con las PBMC y las células NK que son las preferidas. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de la sangre o las PBMC como se describe en la presente.

Los términos "receptor de Fc" o "FcR" se usan para

describir un receptor que se une a la región de Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye los receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII, y Fc γ RIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente de empalmadas de estos receptores. Los receptores de Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor activador") y Fc γ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias similares de aminoácidos que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. El receptor activador Fc γ RIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina de inmunoreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El dominio inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina de inmunoreceptor (ITIM, por sus siglas en inglés) en su dominio citoplásmico, (ver, revisión, M. in Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel y colaboradores, Immunomethods 4:25-34 (1994); y de Haas y colaboradores, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Otros FcR, que incluyen aquellos que se identifiquen en el futuro, se abarcan por el término "FcR" en la presente. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer y colaboradores, J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim y colaboradores, Eur. J. Immunol.

24:2429 (1994)).

"Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula para lisar un objetivo en la presencia del complemento. La ruta de activación de complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo un anticuerpo) vuelta compleja con un antígeno cognado. Para valorar la activación de complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo como se describe en Gazzano-Santoro y colaboradores, J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

El término "variable" se refiere al hecho que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensivamente en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme a todo lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman las regiones estructurales se llaman las regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro FR, adoptando en su mayor parte una configuración de β -hoja,

conectada por tres regiones hipervariables, que forman asas que conectan, y en algunos casos que forman parte de, la estructura de β -hoja. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen conjuntamente en proximidad cercana por los FR y con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat y colaboradores, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están comprendidos directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben varias funciones efectoras, tal como participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC, por sus siglas en inglés).

El término "región hipervariable" como se usa en la presente se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de unión al antígeno. La región hipervariable comprende en general residuos de aminoácido de una "región determinante de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat y colaboradores, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o

aquellos residuos de una de una "asa hipervariable" (por ejemplo los residuos 2632 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Chothia y Lesk J Mol. Biol 196:901-917 (1987)). Los residuos de la "Región menos Variable" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable, diferentes de los residuos de región hipervariable como se define en la presente. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio individual de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de unión a antígeno y es capaz de la reticulación del antígeno.

"Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de unión a antígeno y de reconocimiento de antígeno completo. Esta región consiste de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y de cadena ligera en asociación no covalente ajustada. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero de V_H-V_L . De manera colectiva, las seis regiones hipervariables confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, aún un dominio variable

individual (o la mitad de un Fv que comprenden solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a menor afinidad que el sitio completo de unión. El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH I) de la cadena pesada. Los fragmentos de Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el término carboxi del dominio CH1 de cadena pesada que incluyen uno o más cisteínas de la región de reticulación de anticuerpo. Fab'-SH es la designación aquí para Fab' en el cual los residuos de cisteína de los dominios constantes tienen al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de reticulación entre éstos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos de cualquier especie vertebrada se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), en base a la secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena individual" o "scFv" comprenden los dominios de V_H y V_L del d anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena individual de polipéptido. De manera preferente, el

polipéptido de Fv comprende además un ligador de polipéptido entre los dominios de V_H y V_L que permiten que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv ver Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio pesado variable (V_H) conectado a un dominio ligero variable (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H - V_L). Al usar un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios se esfuerzan para aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA*, 90:6444-6448 (1993).

El término "triacuerpos" o "trímeros trivalentes" se refiere a la combinación de tres anticuerpos de cadena individual. Los triacuerpos se construyen con el término de aminoácido de un dominio V_L o V_H , es decir, sin ninguna secuencia ligadora. Un triacuerpo tiene tres cabezales de Fv con los polipéptidos arreglados de una manera cíclica, de punta a cola. Una posible conformación del triacuerpo es

plana con los tres sitios de unión localizados en un plano a un ángulo de 120 grados entre sí. Los diacuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o trispecíficos.

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y superado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirán con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes puesto que no estará presente al menos un componente del ambiente natural de anticuerpo. Sin embargo, de forma ordinaria, se preparará el anticuerpo mezclado por al menos un paso de purificación.

Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés, por ejemplo, el antígeno CD44, es uno capaz de unirse a este antígeno con suficiente afinidad tal que el anticuerpo es útil como un agente terapéutico de diagnóstico en la selección como objetivo de una célula que expresa el antígeno. Cuando el anticuerpo es uno que se une al CD44, usualmente se unirá de manera preferente a CD44 como lo opuesto a otros receptores, y no incluye unión accidental tal como contacto no específico a Fc, o unión a modificaciones pos-transduccionales comunes a otros antígenos y puede ser uno que no reaccione de forma cruzada de forma significativa

con otras proteínas. Los métodos, para la detección de un anticuerpo que se une de un antígeno de interés, son bien conocidos en la técnica y pueden incluir, pero no se limitan a ensayos tal como FACS, ELISA celular y transferencia Western.

Como se usa en la presente, las expresiones "célula", "línea celular", y "cultivo celular" se usan de manera indistinta, y todas estas designaciones incluyen la progenie. También se entiende que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica como se examina para la célula originalmente transformada. Será claro el contexto donde se proponen designaciones distintas.

"Tratamiento" o "tratar" se refieren tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en donde el objeto es prevenir o desacelerar (disminuir) la condición o trastorno patológico buscado. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en quienes se va a prevenir el trastorno. Por lo tanto, el mamífero que se trata en al presente puede haber sido diagnosticado que tiene el trastorno o se puede predisponer o ser susceptible al trastorno.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o

describen la condición fisiológica de mamíferos que típicamente se caracteriza por crecimiento celular desregulado o muerte. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o malignidades linfoides. Los ejemplos más particulares de estos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón microcíticos, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervicouterino, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulval, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene así como cáncer de cabeza y cuello.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos que incluyen agentes de alquilación tal como tiotepa y ciclosfosfamida (CYTOXAN^{MR}); sulfonatos de alquilo tal como busulfan, improsulfan y

pipsulfan; aziridinas tal como benzodopa, carboquona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tal como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tal como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tal como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliceamicina, carabicina, carnomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5- fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tal como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tal como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tal como ancitabina, azacitidina, 6-

azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tal como calusterona, dromostanolona-propionato, epitioestanol, mepitioestano, testolactono; anti-adrenérgicos tal como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedores de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida-glicósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglucid; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK^{MR}; razoxana; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triaziquona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo paclitaxel (TAXOL^{MR}, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE^{MR}, Aventis, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tal como cisplatina y carboplatina; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina;

xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores tal como anti-estrógenos que incluyen por ejemplo tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasa, 4-hidroxytamoxifeno, trioxifeno, ceoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifena (Fareston); y anti-andrógenos tal como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprólido, y goserelina; y sales, ácidos derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los mismos.

"Mamífero" para los propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo humanos, ratones, ratones SCID o desnudos o razas de ratones, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportivos o de mascota, tal como ovejas, perros, caballos, vacas, etc. De manera preferente, el mamífero en la presente es humano.

"Oligonucleótidos" son polidesoxinucleótidos de cadena doble o individual, de longitud corta que se sintetizan químicamente por métodos conocidos (tal como química de fosfotriéster, de fosfita, o de fosforamidita, usando técnicas de fase sólida tal como se describe en EP

266,032, publicada el 4 de mayo 1988, o mediante compuestos intermedios de desoxinucleósido H-fosfonato como se describe por Froehler y colaboradores, *Nucl Acids Res.*, 14:5399-5407, 1986. entonces se purifican en geles de poliacrilamida.

De acuerdo con la presente invención, las formas "humanizada" y/o "híbridas" de inmunoglobulinas no humanas (por ejemplo murino) se refieren a anticuerpos que contienen inmunoglobulinas híbridas específicas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tal como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que dan por resultado la disminución de la respuesta de un anticuerpo humano anti-ratón (HAMA), anticuerpo humano anti-híbrido (HACA) o un anticuerpo humano (HAHA), en comparación al anticuerpo original, y contienen las porciones necesarias (por ejemplo las CDR, regiones de unión a antígeno, dominios variables y demás) derivadas de la inmunoglobulina no humana, necesaria para reproducir el efecto deseado en tanto que retiene simultáneamente las características de unión que son comprables a la inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los cuales los residuos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo receptor se reemplazan por residuos de la CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como rata o

conejo que tiene la especificidad deseada, afinidad deseada y capacidad deseada. En algunos casos, los residuos de la región menos variable Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los correspondientes residuos no humanos de FR. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de FR o CDR importadas, estas modificaciones se hacen para refinar y optimizar adicionalmente el desempeño del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los residuos de FR son aquellos de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera opcional al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos "deshumanizados" son inmunoglobulinas que son no inmunogénicas, o menos inmunogénicas, a una especie determinada. Se puede lograr la De-inmunización a través de alteraciones estructurales al anticuerpo. Se puede emplear cualquiera de las técnicas de des-inmunización conocidas por aquellos expertos en la

técnica. Una técnica adecuada para des-inmunizar anticuerpos se describe, por ejemplo, en la in WO 00/34317 publicada el 15 de junio de 2000. Un anticuerpo que induce "apoptosis" es uno que induce muerte celular programada por cualquiera medio, ilustrado pero no limitado a la unión de anexina V, actividad de caspasa, fragmentación de ADN, encogimiento celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (llamados cuerpos apoptóticos).

Como se usa en la presente, "citotoxicidad inducida por anticuerpo" se entiende que significa el efecto citotóxico derivado del sobrenadante del hibridoma o anticuerpo producido por el hibridoma depositado con la ATCC como el número de acceso PTA-4621, un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado con la ATCC como el número de acceso PTA-4621, un anticuerpo híbrido del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado con la ATCC como número de acceso PTA-4621, fragmentos de unión a antígeno, o ligandos de antígeno de los mismos, efecto que no necesariamente se relaciona al grado de unión.

A todo el largo de la presente especificación, las líneas de células de hibridoma, así como los anticuerpos monoclonales aislados que se producen de las mismas, se refieren alternativamente por su designación interna H460-16-

2 (murino), (ch)ARH460-16-2-IgG1, (ch)ARH460-16-2 (VK0VH0), (hu) ARH460- 16-2 o Designación de Depositario, ATCC PTA-4621.

Como se usa en la presente, "anticuerpo-ligando" incluye una porción que exhibe especificidad de unión para al menos un epítipo del antígeno objetivo, y que puede ser una molécula intacta de anticuerpo, fragmentos de anticuerpo, y cualquier molécula que tiene al menos una región de unión a antígeno o porción de la misma (es decir, la porción variable de una molécula de anticuerpo) por ejemplo, una molécula de Fv, molécula de Fab, molécula de Fab', molécula de F(ab')₂, un anticuerpo biespecífico, una proteína de fusión, o cualquier molécula genéticamente manejada que reconozca específicamente se una al menos un epítipo del antígeno unido por el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma designada como ATCC PTA-4621 (el antígeno ATCC PTA-4621), un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado con la ATCC como número de acceso PTA-4621, un anticuerpo híbrido del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado con la ATCC como número de acceso PTA-4621 y fragmentos de unión a antígeno.

Como se usa en la presente "anticuerpos modificadores de enfermedad cancerosa" (CDMAB) se refiere a anticuerpos monoclonales que modifican el proceso de la

enfermedad cancerosa de una manera que es benéfico al paciente, por ejemplo al reducir la carga tumoral o al prolongar la supervivencia de los individuos que tienen el tumor, y los anticuerpo-ligandos de los mismos.

Un "agente de unión relacionado a CDMAB", en su sentido más amplio, se entiende que incluye, pero no se limita a, cualquier forma de anticuerpos humanos o no humanos, fragmentos de anticuerpo, ligandos de anticuerpo o similares, que se unen competitivamente al menos un epítipo efectivo de CDMAB.

Un "aglutinante competitivo" se entiende que incluye cualquier forma de anticuerpos humanos o no humanos, fragmentos de anticuerpo, ligandos de anticuerpo, o similares, que tienen afinidad de unión para al menos un epítipo efectivo de CDMAB.

Los tumores que se van a tratar incluye tumores primarios y tumores metastásicos, así como tumores resistentes. Los tumores resistentes incluyen tumores que fallan al responder o son resistentes a tratamiento con agentes quimioterapéuticos solos, anticuerpos solos, radiación sola o combinaciones de los mismos. Los tumores resistentes también abarcan tumores que parecen ser inhibidos por tratamientos para estos agentes pero recubren hasta cinco años, algunas veces hasta diez años o más tiempo después de que se discontinúa al tratamiento.

Los tumores que se pueden tratar incluyen tumores que no están vascularizados, o no aún sustancialmente vascularizados, así como tumores vascularizados. Los ejemplos de tumores sólidos, que se pueden tratar por consiguiente, incluyen, carcinoma de mama, carcinoma pulmonar, carcinoma colorrectal, carcinoma pancreático, glioma y linfoma. Algunos ejemplos de estos tumores incluyen tumores epidermoides, tumores escamosos, tal como tumores de cabeza y cuello, tumores colorrectales, tumores de próstata, tumores de mama, tumores de pulmón, incluyendo tumores de pulmón microcíticos y no microcíticos, tumores pancreáticos, tumores de tiroides, tumores ováricos, y tumores de hígado. Otros ejemplos incluyen sarcoma de Kaposi, neoplasmas del SNC, neuroblastomas, hemangioblastomas capilares, meningiomas y metástasis cerebral, melanoma, carcinomas gastrointestinal y renales y sarcomas, rhabdomyosarcoma, glioblastoma, preferentemente glioblastoma multiforme, y leiomyosarcoma.

Como se usa en la presente, "región de unión a antígeno" significa una región de la molécula que reconoce al antígeno objetivo.

Como se usa en la presente, "inhibe de manera competitiva" significa que es capaz de reconocer y unirse a un sitio determinante al cual se dirige el anticuerpo monoclonal producido por la línea de células de hibridoma designada como ATCC PTA-4621, (el anticuerpo ATCC PTA-4621),

un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado con la ATCC como número de acceso PTA-4621, un anticuerpo híbrido del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado con ATCC como número de acceso PTA-4621, fragmentos de unión a antígeno, o ligandos de anticuerpo de los mismos, usando ensayos convencionales de competición recíproca de anticuerpos. (Belanger L., Sylvestre C. y Dufour D. (1973), Enzyme linked immunoassay for alpha fetoprotein by competitive and sandwich procedures. Clinica Chimica Acta 48, 15).

Como se usa en la presente, "antígeno objetivo" es el antígeno ATCC PTA-4621 o porciones de mismo.

Como se usa en la presente, un "inmunoconjugado" significa cualquier molécula o CDMAB tal como un anticuerpo químicamente o biológicamente enlazado a citotoxinas, agentes radioactivos, citocinas, interferones, porciones indicadores u objetivo, enzimas, toxinas, fármacos anti-tumor o agentes terapéuticos. El anticuerpo o CDMAB se puede enlazar a la citotoxina, agente radioactivo, citocina interferón, porción objetivo o indicadora, enzima, toxina, fármaco anti-tumor o agente terapéutico o cualquier ubicación a lo largo de la molécula en tanto que es capaz de unirse a su objetivo. Los ejemplos de inmunoconjugados incluyen conjugados químicos de toxina de anticuerpo y proteínas de fusión anticuerpo-toxina.

Los agentes radioactivos adecuados para el uso como agentes anti-tumor se conocen por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, se usa ^{131}I o ^{211}At . Estos isotipos se unen al anticuerpo utilizando técnicas convencionales (por ejemplo Pedley y colaboradores, *Br. J. Cancer* 68, 69-73 (1993)). De manera alternativa, el agente anti-tumor que se une al anticuerpo es una enzima que activa un profármaco. Se puede administrar un profármaco que pertenecerá en su forma inactiva hasta que alcanza el sitio del tumor donde se convierte a su forma de citotoxina una vez que se administra el complejo de anticuerpo. En la práctica, el conjugado de anticuerpo anti-enzima se administra al paciente y se deja colocarse en la región del tejido que se va a tratar. El profármaco entonces se administra al paciente de modo que la conversión del fármaco citotóxico se presenta en la región del tejido que se va a tratar. De manera alternativa, el agente anti-tumor conjugado al anticuerpo es una citocina tal como interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4) o factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α). El anticuerpo dirige la citocina al tumor de modo que la citocina media el daño a o destrucción del tumor sin afectar otros tejidos. La citotoxina se fusiona al anticuerpo al nivel de ADN usando técnicas convencionales de ADN recombinante. También se pueden usar interferones.

Como se usa en la presente, una "proteína de

fusión" significa cualquier proteína híbrida en donde se conecta una región de unión a antígeno a una molécula biológicamente activa, por ejemplo, toxina, enzima, proteínas fluorescentes, marcador luminiscente, marca de polipéptido, citocina, interferón, porción objetivo o indicadora o fármaco de proteína.

La invención contempla además CDMAB de la presente invención a la cual se enlazan las porciones objetivo o indicadoras. Las porciones objetivo son los primeros miembros de los pares de unión. Los agentes anti-tumor, por ejemplo, se conjugan a segundos miembros de estos pares y se dirigen de este modo al sitio donde se une la proteína de unión a antígeno. Un ejemplo común de este par de unión es avidina y biotina. En una modalidad preferida, se conjuga biotina al antígeno objetivo del CDMAB de la presente invención, y proporciona de este modo un objetivo para un agente anti-tumor u otra porción que se conjuga a avidina o estreptavidina. De manera alternativa, la biotina u otra porción se enlaza al antígeno objetivo del CDMAB de la presente invención y se usa como un indicador, por ejemplo, en un sistema de diagnóstico donde se conjuga un agente productor de señal detectable a avidina o estreptavidina.

Los agentes productores de señal detectable son útiles *in vivo* e *in vitro* para propósitos de diagnóstico. El agente productor de señal produce una señal medible que es

detectable por medios externos, usualmente la medición de radiación electromagnética. Para la mayor parte, el agente productor de señal es una enzima o cromóforo, o emite luz por fluorescencia, fosforescencia o quimioluminiscencia. Los cromóforos incluyen tintes que absorbe luz en la región ultravioleta o visible, y pueden ser sustratos o productos de degradación de reacciones catalizadas con enzima.

Además, incluido dentro del alcance de la presente invención está el uso del presente CDMAB *in vivo* e *in vitro* para métodos investigativos o de diagnóstico, que son bien conocidos en la técnica. A fin de llevar a cabo los métodos de diagnóstico como se contempla en la presente, la presente invención puede incluir además kits, que contienen el CDMAB de la presente invención. Estos kits serán útiles para la identificación de individuos en riesgo de ciertos tipos de cánceres al detectar la sobre-expresión del antígeno objetivo del CDMAB en las células de estos individuos.

Kits de ensayo de diagnóstico

Se contempla utilizar el CDMAB de la presente invención en la forma de un kit de ensayo de diagnóstico para determinar la presencia de un tumor. El tumor se detectará en general en un paciente en base a la presencia de uno o más antígenos específicos de tumor, por ejemplo, proteínas y/o polinucleótidos que codifican para estas proteínas en una muestra biológica, tal como sangre, suero, orina y/o biopsias

tumorales, muestras que se habrán obtenido del paciente.

Las proteínas funcionan como marcadores que indican la presencia o ausencia de un tumor particular, por ejemplo, un tumor de colon, mama, pulmón o próstata. Además se contempla que el antígeno tendrá utilidad para la detección de otros tumores cancerosos. La inclusión en los kits de ensayo de diagnóstico de los agentes de unión comprendidos de los CDMAB de la presente invención, o agentes de unión relacionados a CDMAB, permite la detección del nivel de antígeno que se une al agente en la muestra biológica. Se pueden usar cebadores y sondas de polinucleótido para detectar el nivel del ARNm que codifica para una proteína tumoral, que también es indicativo de la presencia o ausencia de un cáncer. A fin de que el ensayo de unión sea de diagnóstico, los datos habrán de ser generados para correlacionar niveles estadísticamente significativos de antígeno, con relación a lo que está presente en el tejido normal, para volver el reconocimiento de la unión definitivamente de diagnóstico para la presencia de un tumor canceroso. Se contempla que serán útiles una pluralidad de formatos para el ensayo de diagnóstico de la presente invención, como se conocen por aquellos expertos en la técnica, para usar un agente de unión para detectar los marcadores de polipéptido en una muestra. Por ejemplo, como se ilustra en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*,

Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Adicionalmente se contemplan cualquiera y todas las combinaciones, permutaciones o modificaciones de los formatos de ensayo de diagnóstico descritos anteriormente.

La presencia o ausencia de un cáncer en un paciente se determinará típicamente al (a) poner en contacto una muestra biológica obtenida de un paciente con un agente de unión; (b) detectar en la muestra un nivel del polipéptido que se une al agente de unión; y (c) comparar el nivel del polipéptido con un valor predeterminado de corte.

En una modalidad ilustrativa, se contempla que el ensayo comprenderá el uso de un agente de unión basado en CDMAB inmovilizado en un soporte sólido para unirse a y para remover el polipéptido del resto de la muestra. El polipéptido unido entonces se puede detectar usando un reactivo de detección que contiene un grupo indicador y se une de manera específica al complejo de agente de unión/polipéptido. Los reactivos ilustrativos de detección pueden incluir un agente de unión basado en CDMAB que se une de manera específica al polipéptido o un anticuerpo u otro agente que se une de manera específica al agente de unión, tal como anti-inmunoglobulina, proteína G, proteína A o una lecitina. En una modalidad alternativa, se contempla que se puede utilizar un ensayo competitivo, en el cual se marca un polipéptido con un grupo indicador y se deja unir al agente

inmovilizado de unión después de la incubación del agente de unión con la muestra. Indicativo de la reactividad de la muestra con el agente inmovilizado de unión, es el grado al cual los componentes de la muestra inhiben la unión del polipéptido marcado al agente de unión. Los polipéptidos adecuados para el uso dentro de los ensayos incluyen proteínas específicas de tumor de longitud completa y/o porciones de las mismas, a los cuales el agente de unión tiene afinidad de unión.

El kit de diagnóstico se proporcionará con un soporte sólido que puede estar en la forma de cualquier material conocido por aquellos expertos en la técnica a lo cual se puede unir la proteína. Los ejemplos adecuados pueden incluir una concavidad de prueba en una placa de microtítulo o una membrana de nitrocelulosa u otra membrana adecuada. De manera alternativa, el soporte puede ser una cuenta o disco, tal como vidrio, fibra de vidrio, látex o un material plástico tal como poliestireno o cloruro de polivinilo. El soporte también puede ser una partícula magnética o un sensor de fibra óptica, tal como aquellos descritos, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos número 5,359,681.

Se contempla que el agente de unión se inmovilizará en el soporte sólido usando una variedad de técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica, que se

describen ampliamente en la literatura de patentes y científica. El término "inmovilización" se refiere tanto a asociación no covalente, tal como adsorción, como unión covalente, aquí, en el contexto de la presente invención, puede ser un enlace directo entre el agente y los grupos funcionales en el soporte, o puede ser un enlace por medio de un agente reticulador. En una modalidad preferida, aunque no limitante, se prefiere la inmovilización por adsorción a una concavidad en una placa de microtítulo o a una membrana. Se puede lograr la adsorción al poner en contacto el agente de unión, en un amortiguador adecuado, con el soporte sólido de una cantidad adecuada de tiempo. El tiempo de contacto puede variar con la temperatura, y en general están adentro de un intervalo de entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 1 día.

La unión covalente del agente de unión a un soporte sólido se logrará ordinariamente al hacer reaccionar primero el soporte con un reactivo bifuncional que reaccionará tanto con el soporte como con un grupo funcional, tal como un grupo hidroxilo o amino, en el agente de unión. Por ejemplo, el agente de unión se puede unir de manera covalente a soportes que tienen un revestimiento de polímero apropiado usando benzoquinona o por condensación de un grupo aldehído en el soporte dentro de una amina y un hidrógeno activo en el compañero de unión (ver, por ejemplo, Pierce Immunotechnology

Catalog and Handbook, 1991, en A12 A13).

Además, se contempla que el kit de ensayo de diagnóstico tomará la forma de un ensayo de intercalación de dos anticuerpos. Este ensayo se puede realizar al poner en contacto primero un anticuerpo, por ejemplo, el CDMAB actualmente descrito que se ha inmovilizado en un soporte sólido, comúnmente la concavidad de una placa de microtítulo, con la muestra, tal que los polipéptidos dentro de la muestra se dejen unir al anticuerpo inmovilizado. Entonces se remueve la muestra no unida de los complejos inmovilizados de polipéptido-anticuerpo y se adiciona un reactivo de detención (preferentemente un segundo anticuerpo capaz de unirse a un sitio diferente en el polipéptido) que contiene un grupo indicador. La cantidad de reactivo de detección que permanece unida al soporte sólido entonces se determina usando un método apropiado para el grupo indicador específico.

En una modalidad específica, se contempla que una vez que el anticuerpo se inmovilice en el soporte como se describe anteriormente, los sitios restantes de unión a proteína en el soporte se bloquearán, mediante el uso de cualquier agente bloqueador adecuado conocido por aquellos expertos en la técnica, tal como albúmina de suero bovino o Tween 20^{MR} (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). El anticuerpo inmovilizado entonces se incubará con la muestra,

y el polipéptido se dejará unir al anticuerpo. La muestra se puede diluir con un diluyente adecuado, tal como solución salina amortiguada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) antes de la incubación. En general, se seleccionará un tiempo apropiado de contacto (por ejemplo, tiempo de incubación) para corresponder a un periodo de tiempo suficiente para detectar la presencia del polipéptido dentro de una muestra obtenida de un individuo con el tumor específicamente seleccionado. De manera preferente, el tiempo de contacto es suficiente para lograr un nivel de unión que es al menos aproximadamente 95 por ciento de aquel logrado en el equilibrio entre el polipéptido unido y no unido. Aquellos expertos en la técnica reconocerán que el tiempo necesario para lograr el equilibrio se puede determinar fácilmente al valorar el nivel de unión que se presenta durante un periodo de tiempo.

Además se contempla que la muestra no unida entonces se removerá por lavado del soporte sólido con un amortiguador apropiado. El segundo anticuerpo, que contiene un grupo indicador, entonces se adicionará al soporte sólido. La incubación del reactivo de detección con el complejo inmovilizado de anticuerpo-polipéptido entonces se llevará a cabo durante una cantidad de tiempo suficiente para detectar el polipéptido unido. De manera subsiguiente, el reactivo de detección no unido entonces se removerá y el reactivo de

detección unido se detectará usando el grupo indicador. El método empleado para detectar el grupo indicador es necesariamente específico al tipo de grupo indicador seleccionado, por ejemplo para grupos radioactivos, conteo por escintilación o métodos autorradiográficos en general son apropiados. Se pueden usar métodos espectroscópicos para detectar tintes, grupos luminiscentes y grupos fluorescentes. Se puede detectar biotina usando avidina, acoplada a un diferente grupo indicador (comúnmente un grupo radioactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos indicadores enzimáticos se pueden detectar en general por la adición del sustrato (en general durante un periodo específico de tiempo), seguido por análisis espectroscópico u otros de los productos de reacción.

A fin de utilizar el kit de ensayo de diagnóstico de la presente invención para determinar la presencia o ausencia de un cáncer, tal como cáncer de próstata, la señal detectada del grupo indicador que permanece unida al soporte sólido en general se comparará a una señal que corresponde a un valor predeterminado de corte. Por ejemplo, un valor ilustrativo de corte para la detección de un cáncer puede ser la señal media promedio obtenida cuando el anticuerpo inmovilizado se incubaba con muestras de pacientes sin el cáncer. En general, una muestra que genera una señal que es aproximadamente tres desviaciones estándar por arriba del

valor predeterminado de corte se considerará positiva para el cáncer. En una modalidad alternativa, el valor de corte se puede determinar al usar una Curva de Receptor-Operador, de acuerdo al método de Sackett et al., Clinical Epidemiology. A Basic Science for Clinical Medicine, Little Brown and Co., 1985, p. 106-7. En esta modalidad, el valor de corte se puede determinar de una gráfica de pared de proporciones positivas verdaderas (es decir, sensibilidad) y proporciones positivas falsas (100 por ciento de especificidad) que corresponden a cada posible valor de corte para el resultado de prueba de diagnóstico. El valor de corte en la gráfica que es el más cercano a la esquina superior izquierda (es decir, el valor que se acerca al área más grande) es el valor de corte más exacto, y una muestra que genera una señal que es mayor que el valor de corte determinado por este método se puede considerar positiva. De manera alternativa, el valor de corte se puede desplazar a la izquierda a lo largo de la gráfica, para reducir al mínimo la proporción positiva falsa, o a la derecha, para reducir al mínimo la proporción negativa falsa. En general, una muestra que genera una señal que es mayor que el valor de corte determinado por este método se considera positiva para un cáncer.

Se contempla que el ensayo de diagnóstico habilitado por el kit se realizará en ya sea un formato de prueba de tira o de flujo, en donde el agente de unión se

inmoviliza en una membrana, tal como nitrocelulosa. En la prueba de flujo, los polipéptidos dentro de la muestra se unen al agente inmovilizado de unión conforme la muestra pasa a través de la membrana. Un segundo agente marcado de unión entonces se une al complejo de agente de unión-polipéptido conforme una solución que contiene el segundo agente de unión fluye a través de la membrana. La detección del segundo agente unido de unión entonces se puede realizar como se describe anteriormente. En el formato de prueba de tira, un extremo de la membrana a la cual se une el agente de unión se sumergirá en una solución que contiene la muestra. La muestra migra a lo largo de la membrana a través de una región que contiene el segundo agente de unión y al área del agente inmovilizado de unión. La concentración del segundo agente de unión en el área del anticuerpo inmovilizado indica la presencia de un cáncer. La generación de un patrón, tal como una línea, en el sitio de unión, que se puede leer visualmente, será indicativa de una prueba positiva. La ausencia de este patrón indica un resultado negativo. En general, la cantidad de agente de unión inmovilizada en la membrana se selecciona para generar un patrón visualmente discernible cuando la muestra biológica contiene un nivel de polipéptido que será suficiente para generar una señal positiva en el ensayo de intercalación de dos anticuerpos, en el formato analizado anteriormente. Los agentes preferidos

de unión para el uso en el presente ensayo de diagnóstico son los anticuerpos actualmente descritos, fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y cualquiera de los agentes de unión relacionados a CDMAB como se describe en la presente. La cantidad de anticuerpo movilizado en la membrana será cualquier cantidad efectiva para producir un ensayo de diagnóstico, y puede variar desde aproximadamente 25 nanogramos a aproximadamente 1 microgramo. Típicamente, estas pruebas se pueden realizar con una cantidad muy pequeña de muestra biológica.

Adicionalmente, la CDMAB de la presente invención se puede usar en el laboratorio para investigación debido a su capacidad para identificar su antígeno objetivo.

A fin de que la invención descrita en la presente se pueda entender más completamente, se expone la siguiente descripción.

La presente invención proporciona CDMAB (es decir, CDMAB con ATCC PTA-4621, un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado con la ATCC como número de acceso PTA-4621, un anticuerpo híbrido del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado con la ATCC como número de acceso PTA-4621, fragmentos de unión a antígeno, o ligandos de anticuerpo de los mismos) que reconocen de manera específica y se unen al antígeno ATCC PTA-4621.

El CDMAB del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado con la ATCC como número de acceso PTA-4621 puede estar en cualquier forma en tanto que tenga una región de unión a antígeno que inhiba competitivamente la unión inmunespecífica del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma ATCC PTA-4621 a su antígeno objetivo. De esta manera, cualquier proteína recombinante (por ejemplo, proteínas de fusión en donde el anticuerpo se combina con una segunda proteína tal como una linfoquina o un factor de crecimiento inhibitorio de tumor) que tiene la misma especificidad de unión como el anticuerpo ATCC PTA-4621 caen dentro del alcance de esta invención.

En una modalidad de la invención, el CDMAB es el anticuerpo ATCC PTA-4621.

En otras modalidades, el CDMAB es un fragmento de unión a antígeno que puede ser una molécula de Fv (tal como una molécula de Fv de cadena individual), una molécula de Fab, una molécula de Fab', una molécula de F(ab')₂, una proteína de fusión, un anticuerpo biespecífico, un heteroanticuerpo o cualquier molécula recombinante que tiene la región de unión a antígeno del anticuerpo ATCC PTA-4621. El CDMAB de la invención se dirige al epítipo al cual se dirige el anticuerpo monoclonal ATCC PTA-4621.

El CDMAB de la invención se puede modificar, es decir, por modificaciones de aminoácido dentro de la

molécula, para producir moléculas de derivados. También puede ser posible la modificación química. También puede ser posible la modificación por mutación directa, por métodos de maduración por afinidad, visualización en fagos o transposición de cadena.

Se puede modificar o mejorar la afinidad y especificidad al mutar la CDR y/o los residuos de fenilalanina-triptofano (FW, por sus siglas en inglés) y al examinar los sitios de unión a antígeno que tienen las características deseadas (por ejemplo, Yang et al., J. Mol. Biol., (1995) 254: 392-403). Una manera para aleatorizar los residuos individuales o combinaciones de residuos de modo que en una población de sitios de unión a antígeno de otro modo idénticos, se encuentren en posiciones particulares los subconjuntos de dos a veinte aminoácidos. De manera alternativa, se pueden inducir mutaciones sobre una variedad de residuos por métodos de PCR propensos a error (por ejemplo, Hawkins et al., J. Mol. Biol., (1992) 226: 889-96). En otro ejemplo, los vectores de visualización en fago que contienen genes de región variable de cadena pesada y ligera se pueden propagar en cepas mutadoras de *E. coli* (por ejemplo, Low et al., J. Mol. Biol., (1996) 250: 359-68). Estos métodos de mutagénesis son ilustrativos de los muchos métodos conocidos por el experto en la técnica.

Otra manera para incrementar la afinidad de los

anticuerpos de la presente invención es llevar a cabo la trasposición de cadena, donde la cadena pesada o ligera se aparea al azar con otras cadenas pesadas o ligeras para preparar un anticuerpo con mayor afinidad. Las varias CDR de los anticuerpos también se pueden trasponer con las CDR correspondientes en otros anticuerpos.

La moléculas de derivados retendrán la propiedad funcional del polipéptido, específicamente, la molécula que tiene estas sustituciones permitirá aún la unión del polipéptido al antígeno ATCC PTA-4621 o porciones del mismo.

Estas sustituciones de aminoácido incluyen, pero no se limitan necesariamente a, sustituciones de aminoácido conocidas en la técnica como "conservadoras".

Por ejemplo, es un principio bien establecido de química de proteína que ciertas sustituciones de aminoácido, tituladas "sustituciones conservadoras de aminoácido", se puedan hacer frecuentemente en una proteína sin alterar ya sea la conformación o la función de la proteína.

Estos cambios incluyen la sustitución de cualquiera de isoleucina (I), valina (V), y leucina (L) por cualquiera de los otros de éstos aminoácidos hidrófobos; ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E) y viceversa; glutamina (Q) por asparagina (N) y viceversa; y serina (S) por treonina (T) y viceversa. Otras sustituciones también se pueden considerar conservadoras, dependiendo del ambiente del aminoácido

particular y su papel en la estructura tridimensional de la proteína. Por ejemplo, la glicina (G) y la alanina (A) pueden ser frecuentemente intercambiables, como pueden ser alanina y valina (V). La metionina (M), que es relativamente hidrófoba, se puede intercambiar frecuentemente con leucina e isoleucina, y algunas veces con valina. La lisina (K) y la arginina (R) se intercambian frecuentemente en ubicaciones en las cuales la falla significativa del residuo de aminoácido es su carga y los diferentes pK de estos dos residuos de aminoácido no son significativos. Aún otros cambios se pueden considerar "conservadores" en ambientes particulares.

Ejemplo 1

Experimento de Tumor *in vivo* con Células de Cáncer de Mama MDA-MB-468 Humano

El H460-16-2 ha demostrado anteriormente (como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 10/603,000) eficiencia contra un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano MDA-MB-231. Para extender este hallazgo, se probó H460-16-2 en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano MDA-MB-468. Con referencia a las Figuras 1 y 2, se implantaron ratones desnudos a químicas hembras de 8 a 10 semanas de edad con 5 millones de células de cáncer de mama humano (MDA-MB-468) en 100 microlitros de solución PBS inyectada subcutáneamente en el flanco derecho de cada ratón. Los ratones se dividieron

al azar en 2 grupos de tratamiento de 10. En el día 35 después de la implantación cuando el volumen promedio del tumor de los ratones alcanzó aproximadamente 83 mm^3 , se administró intraperitonealmente 20 mg/kg del anticuerpo de prueba H460-16-2 o control con amortiguador a cada cohorte en un volumen de 300 microlitros después de la dilución de la concentración madre con un diluyente que contuvo KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 137 mM y Na_2HPO_4 20 mM. Las muestras de anticuerpo y de control entonces se administraron tres veces por semana durante aproximadamente 3 semanas. Se midió el crecimiento del tumor aproximadamente cada 3-10 días con calibradores. El tratamiento se completó después de 8 dosis de anticuerpo. Se registraron los pesos corporales de los animales al mismo tiempo como la medición de tumor. A todos los animales se les practicó la eutanasia de acuerdo a las guías de CCAC al final del estudio una vez que se ha alcanzado el punto final.

El H460-16-2 inhibió significativamente el crecimiento tumoral en un modelo establecido *in vivo* de MDA-MB-468 de células de cáncer humano de mama. El tratamiento con el anticuerpo ARIUS H460-16-2 redujo el crecimiento de los tumores de MDA-MB-468 por 62.8 por ciento ($p = 0.005506$, prueba t), en comparación al grupo tratado con amortiguador, como se determina en el día 79, 26 días después de la última dosis del anticuerpo (Figura 1). Se calculó la inhibición

del crecimiento tumoral al sustraer el volumen tumoral inicial tanto de los grupos de control como de tratamiento.

No hubo signos clínicos obvios de toxicidad a todo lo largo del estudio. El peso corporal medido a intervalos semanales fue un sustituto para el bienestar y falla para proliferar. El peso corporal medio se incrementó en todos los grupos durante la duración del estudio (Figura 2). La ganancia media de peso entre el día 35 y el 79 fue de 1.82 g (7.2 por ciento) en el grupo de control y 2.30 g (9.9 por ciento) en el grupo tratado con H460-16-2. No hubo diferencia significativa entre los grupos durante el periodo de tratamiento.

En resumen, el H460-16-2 fue bien tolerado e inhibió significativamente el crecimiento tumoral en un modelo de xenoinjerto de cáncer humano de mama.

Ejemplo 2

Experimento de Tumor *in vivo* con Células de Cáncer de Próstata PC-3 Humano

El H460-16-2 ha demostrado anteriormente (como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 10/810,165) eficiencia contra un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata humano PC-3 en unión con el fármaco quimioterapéutico, Cisplatina. Para determinar si la eficiencia se puede demostrar en ausencia del fármaco, se probó H460-16-2 sólo en un modelo de xenoinjerto de cáncer de

raza diferente de ratón. Con referencia a las Figuras 3 y 4, se implantaron ratones desnudos a químicos machos de 8 a 10 semanas de edad con 5 millones de células de cáncer de próstata humano (PC-3) en 100 microlitros de solución PBS inyectada subcutáneamente en el flanco derecho de cada ratón. Los ratones se dividieron al azar en 2 grupos de tratamiento de 10. En el día 6 después de la implantación cuando el volumen promedio del tumor de ratón alcanzó aproximadamente 95 mm^3 , se administraron intraperitonealmente 20 mg/kg del anticuerpo de prueba H460-16-2 o control con amortiguador a cada cohorte en un volumen de 300 microlitros después de la dilución de la concentración madre con un diluyente que contuvo KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 137 mM y Na_2HPO_4 20 mM. Las muestras de anticuerpo y de control entonces se administraron tres veces por semana durante aproximadamente 3 semanas. Se midió el crecimiento tumoral 4-10 días con calibradores. El tratamiento se completó después de 10 dosis de anticuerpo. Se registraron los pesos corporales de los animales al mismo tiempo como la medición tumoral. A todos los animales se les practicó la eutanasia de acuerdo a las guías de CCAC al final del estudio una vez que se ha alcanzado el punto final.

El H460-16-2 inhibió significativamente el crecimiento tumoral en el modelo establecido *in vivo* de PC-3 de cáncer humano de próstata. El tratamiento con el

anticuerpo ARIUS H460-16-2 redujo el crecimiento de tumores de PC-3 por 61.9 por ciento ($p = 0.002414$, prueba t), en comparación al grupo tratado con amortiguador, como se determina en el día 71, 44 días después de la última dosis del anticuerpo (Figura 3). Se calculó la inhibición del crecimiento tumoral al sustraer el volumen inicial de tumor tanto de los grupos de control como de tratamiento.

No hubo signos clínicos obvios de toxicidad a todo lo largo del estudio. El peso corporal medido en intervalos semanales fue un sustituto para el bienestar y falla para proliferar. El peso corporal medio se incrementó en todos los grupos durante la duración del estudio (Figura 4). La ganancia media de peso entre el día 6 y el 71 fue de 3.47 g (14.3 por ciento) en el grupo de control y 3.86 g (15.1 por ciento) en el grupo tratado con H460-16-2. No hubo diferencia significativa entre los grupos durante el periodo de tratamiento.

En resumen, el H460-16-2 fue bien tolerado y como anticuerpo solo, inhibió significativamente el crecimiento tumoral en este modelo de xenoinjerto de cáncer humano de próstata.

Ejemplo 3

Experimento de tumor *in vivo* con células de cáncer humano de mama MDA-MB-231

El H460-16-2 ha demostrado anteriormente (como se

describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 10/603,000) eficiencia contra un modelo de xenoinjerto de cáncer humano de mama MDA-MB-231. Para determinar los niveles efectivos de dosis, se probó (ch)ARH460-16-2-IgG1 a varias dosis en un modelo establecido de xenoinjerto de cáncer humano de mama MDA-MB-231. Con referencia a las Figuras 5 y 6, se implantaron ratones SCID hembras de 8 a 10 semanas de edad con 5 millones de células de cáncer humano de mama (MDA-MB-231) en 100 microlitros de solución PBS inyectada subcutáneamente en el flanco derecho de cada ratón. Los ratones se dividieron al azar en 5 grupos de tratamiento de 10 cuando el volumen tumoral medio de ratón alcanzó aproximadamente 100 mm^3 . En el día 11 después de la implantación, se administraron intraperitonealmente 20, 10, 2 ó 0.2 mg/kg del anticuerpo de prueba (ch)ARH460-16-2-IgG1 lo control con amortiguador a cada cohorte en un volumen de 300 microlitros después de la dilución de la concentración madre con un diluyente que contuvo KCl 2.7 mM, KH_2PO_4 1 mM, NaCl 137 mM y Na_2HPO_4 20 mM. Las muestras de anticuerpo y de control entonces se administraron tres veces por semana durante aproximadamente 3 semanas. Se midió el crecimiento tumoral cada 4-7 días con calibradores. El tratamiento se completó después de 10 dosis de anticuerpo. Se registraron los pesos corporales de los animales al mismo tiempo como la medición tumoral. A todos los animales se les practicó la eutanasia

de acuerdo a las guías de CCAC al final del estudio una vez que se ha alcanzado el punto final.

El (ch)ARH460-16-2-IgG1 demostró inhibición dependiente de la dosis y regresión de crecimiento tumoral en el modelo establecido *in vivo* de MDA-MB-231 de cáncer humano de mama a la dosis más baja de 0.2 mg/kg durante el periodo de tratamiento entre el día 11 y el día 32, y aún inhibición continuamente sostenida de crecimiento tumoral después de la dosificación. El tratamiento con el anticuerpo ARIUS (ch)ARH460-16-2-IgG1 a dosis de 20, 10, 2 ó 0.2 mg/kg redujo el crecimiento de tumores de MDA-MB-231 por 91.3, 89.0, 86.1 ó 63.5 por ciento ($p = 0.00001$, prueba t), en comparación al grupo tratado con amortiguador, como se determina en el día 55, 23 días después de la última dosis del anticuerpo (Figura 5).

No hubo signos clínicos obvios de toxicidad a todo lo largo del estudio. El peso corporal medido a intervalos semanales fue un sustituto para el bienestar y falla para proliferar. El peso corporal medio se incrementó en todos los grupos durante la duración del estudio (Figura 6). La ganancia media de peso entre el día 0 y el día 55 fue de 2.33 (11.9 por ciento) en el grupo de control y 2.44 g (12.8 por ciento), 2.0 g (10.0 por ciento) 2.0 (10.5 por ciento) y 2.0 g (10.5 por ciento) en el grupo tratado con H460-16-2 a dosis de 20, 2 y 0.2 mg/kg, respectivamente. No hubo diferencias

significativas entre los grupos durante el período de tratamiento.

En resumen, el (ch)ARH460-16-2-IgG1 fue bien tolerado e inhibió significativamente el crecimiento tumoral y produjo regresión del tamaño del tumor en este modelo de xenoinjerto de adenocarcinoma humano de mama de una manera dependiente de la dosis a todas las dosis probadas.

Ejemplo 4

Tinción de Tejido de Tumor Humano de Colon

Se llevaron a cabo estudios de IHC en tejidos de tumor de colon humano para evaluar adicionalmente la unión de H460-16-2 a cánceres humanos. Se realizaron estudios de optimización de IHC a fin de determinar las condiciones para experimentos adicionales.

La unión de H460-16-2 a 59 tejidos de tumor humano de colon se realizó usando un micro arreglo de tejido tumoral humano de colon (Imgenex, San Diego, CA). Las secciones de tejido se desparafinaron al secar en un horno a 58°C durante 1 hora y se les quitó la cera al sumergir en xileno 5 veces durante 4 minutos cada uno en jarras Coplin. Después del tratamiento a través de una serie de lavados graduados de etanol (de 100 por ciento a 75 por ciento) las secciones se rehidrataron en agua. Los portaobjetos se sumergieron en amortiguador de citrato 10 mM a pH 6 (Dako, Toronto, Ontario) luego se trataron con microondas a ajustes de potencia, media

y baja durante 5 minutos cada uno y finalmente se sumergieron en PBS fría. Entonces los portaobjetos se sumergieron en solución de peróxido de hidrógeno al 3 por ciento durante 6 minutos, se lavaron con PBS 3 veces durante 5 minutos cada una, se secaron y se incubaron con solución de bloqueo universal (Dako, Toronto, Ontario) durante 5 minutos a temperatura ambiente. El H460-16-2, anti-actina de músculo humano (Clone HHF35, Dako, Toronto, Ontario) o anticuerpo de control de isotipo (dirigido contra glucosa-oxidasa de *Aspergillus niger*, una enzima que ni está presente ni es inducible en tejidos mamíferos; Dako, Toronto, Ontario) se diluyó en el amortiguador de dilución de anticuerpo (Dako, Toronto, Ontario) a su concentración de trabajo (5 microgramos/mL para cada anticuerpo excepto para anti-actina que se diluyó a 0.5 microgramos/mL) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Los portaobjetos entonces se lavaron con PBS 3 veces durante 5 minutos cada uno. La inmuno-reactividad de los anticuerpos primarios se detectó/visualizó con anticuerpos secundarios a HRP como se suministran (Dako Envision System, Toronto, Ontario) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de este método, los portaobjetos se lavaron con PBS 3 veces durante 5 minutos cada vez y se desarrolló una reacción de color al adicionar solución de sustrato de cromógeno de DAB (tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobenzidina, Dako,

Toronto, Ontario) para tinción de inmunoperoxidasa durante 10 minutos a temperatura ambiente. El lavado de los portaobjetos en agua de grifo terminó la reacción cromogénica. Después de la contra-tinción con Hematoxilina de Meyer (Sigma Diagnostics, Oakville, ON), los portaobjetos se deshidrataron con etanoles graduados (75 por ciento a 100 por ciento) y se limpiaron con xileno. Usando un medio de montaje (Dako Faramount, Toronto, Ontario) los portaobjetos se cubrieron con los portaobjetos. Los portaobjetos se examinaron microscópicamente usando un Axiovert 200 (Ziess Canadá, Toronto, ON) y las imágenes digitales se adquirieron y almacenaron usando un Software de Formación de Imagen Northen Eclipse (Mississauga, ON). Los resultados se leyeron, se clasificaron y se interpretaron por un histopatologo.

La Figura 7 presente un resumen de los resultados de la tinción de H460-16-2 de un arreglo de tejidos de tumor humano de colon. De la tabla, 36/39 (61 por ciento) de los tumores probados fueron positivos para H460-16-2. El H460-16-2 fue específico para células de tumor y fibroblasto de estroma (Figuras 8A-8B). La localización celular fue principalmente membranosa y membranosa citoplásmica. El porcentaje de células positivas varió de <10 por ciento a > 50 por ciento indicando unión heterogénea del anticuerpo a células tumorales. La relación de la unión del anticuerpo a las etapas de los tumores (American Joint Committee on

Cancer, AJCC staging) no se puede valorar apropiadamente debido a la discrepancia en el número de tumores entre diferentes etapas de tumor, siendo 0/0, 19/29 (66 por ciento), 14/25 (56 por ciento) 3/5 (60 por ciento) a las etapas I, II, III y IV, respectivamente. El anti-actina, como el control de anticuerpo positivo, mostró la unión positiva esperada a tejidos musculares. El control negativo con el isotipo de IgG mostró unión negativa a los tejidos probados.

Como resultado de su unión a las células de cáncer de colon, se puede extender el beneficio terapéutico de H460-16-2 al tratamiento de cáncer de colon.

Ejemplo 5

Reactividad Cruzada en Humano Normal y Mono Cynomolgus

Se llevaron a cabo estudios de IHC para caracterizar el antígeno H460-16-2 de los tejidos normales de mono cynomolgus. Se llevaron a cabo experimentos de titulación de anticuerpo con el anticuerpo (ch)ARH460-16-2-IgG1 (marcado con FITC por LifeSpan, Seattle, WA, EUA) y un anticuerpo de control de isotipo (Sigma, marcado por LifeSpan, Seattle, WA, EUA) para establecer la concentración que daría por resultado el fondo mínimo y detección máxima de la señal. Para optimización, se realizaron diluciones en serie a 20 microgramos/mL, 10 microgramos/mL, 5 microgramos/mL y 2.5 microgramos/mL en tejido fresco-congelado incrustado con parafina, fijado en formalina. El

anticuerpo (ch)ARH460-16-2-IgG1 y el anticuerpo de control de isotipo se usaron como los anticuerpos primarios, el anticuerpo secundario fue un anticuerpo anti-FITC en conejo (DAKO, Mississauga, ON, Canadá). El sistema de detección principal consistió del polímero marcado con peroxidasa DAKO Envision (DAKO, Mississauga, ON, Canadá) con DAB como el cromonógeno, que se usó para producir un depósito de color café. El control negativo consistió de utilizar el procedimiento completo de inmunohistoquímica en secciones adyacentes en la ausencia de anticuerpo primario. Se capturaron imágenes de alta potencia de los portaobjetos con una cámara digital de DVC 1310C acoplada a un microscopio Nikon. Las imágenes de secciones completas se capturaron con un aparato de formación de imagen patentado LifeSpan (sistema ALIAS) equipado con un microscopio Leica DMLA. Las imágenes se almacenaron como archivos TIFF con Adobe Photoshop.

El anticuerpo (ch)ARH460-16-2-IgG1 mostró tinción fuerte de tejidos de control humano positivo a 2.5 microgramos/mL, con mayor fondo a mayores concentraciones de anticuerpo. Por lo tanto, es una concentración de 2.5 microgramos/mL para estudios adicionales de inmunohistoquímica. Así también, los tejidos incrustados en parafina fijados con formalina mostraron menos tinción de fondo que las secciones congeladas; por lo tanto, se usaron tejidos fijados para estudios adicionales de IHC. En resumen,

del estudio de optimización en un número limitado de muestras, la señal se presentó tanto en muestras humanas y de primate de tejidos fijados en formalina, aunque se tiñó más positivamente piel humana que los tejidos cutáneos de primate.

Se llevó a cabo el IHC extendido en 16 tejidos incrustados en parafinas fijados con formalina de humano normal y mono cynomolgus (sangre, médula sanguínea, cerebro, colon, ojo, corazón, riñón, hígado, pulmón, músculo esquelético, ovario, páncreas, piel, bazo, testículos y tiroides) (Figuras 9 y 10).

Dentro de las muestras humanas, el (ch)ARH460-16-2-IgG1 demostró tinción citoplásmica o de membrana débil o moderada en los siguientes tipo de tejidos: neutrófilos, subconjuntos de macrófagos y linfocitos, la serie mieloide en la médula ósea, subconjuntos de célula de plasma, pneumocitos tipo II, queratinocitos epidérmicos y apéndices cutáneos. Los tractos de materia blanca también fueron débilmente positivos. La tinción nuclear débil se vio en neuronas y glia, células ganglionales entéricas, y una muestra de cada uno de los testículos y epitelios respiratorios. Los otros tipos de células y tejidos fueron negativos, incluyendo la serie eritroide y megacariocitos, neuronas y glia, epitelio colónico, músculo liso, endotelio, fibroblastos, el ojo excepto para macrófagos, corazón, hígado, ovarios, páncreas,

músculo esquelético, linfocitos endotelio del bazo, y tiroides. El anticuerpo de control de isotipo de IgG fue negativo en todos los tejidos humanos probados.

Dentro de los tejidos de mono, hubo un mayor nivel de tinción nuclear a través de muchos tejidos en comparación a las muestras humanas. La tinción citoplásmica débil a moderada también se observó en neutrófilos, subconjuntos de neuronas, subconjuntos de células epiteliales colónicas, subconjuntos de linfocitos y macrófagos, conductos de recolección ocasional, múltiples tipos celulares en el ovario y ojo, y espermatoцитos. Se vio tinción nuclear en la mayoría de los tipos celulares que también fueron positivos para tinción citoplásmica. Los siguientes tipos de células mostraron tinción nuclear en la ausencia de tinción citoplásmica o de membrana: glia, células meningeales, miocitos cardiacos, subconjuntos de células en glomérulos renales y túbulos y conductos renales, epitelio de conducto biliar, epitelio respiratorio y pneumocitos, e islotes de langerhans. El control de isotipo de IgG en tejidos de monos cynomolgus mostró tinción nuclear débil en neuronas y tinción citoplásmica débil en células neurondrocrinas del colon y tractos de materia blanca.

Cuando se comparan los patrones de tinción entre las dos especies, la tinción nuclear incrementada de las muestras de monos cynomolgus fue evidente a través de varios

tipos de células incluyendo neuronas, miocitos cardiacos, epitelio tubular renal, y conductos biliares. Con la tinción citoplásmica o de membrana, se observaron las diferentes diferencias: tinción ligeramente incrementada se vio en células epiteliales colónicas de monos cynomolgus, neuronas oocitos y epitelio folicular del ovario, y espermatoцитos. Los precursores mieloides de la médula ósea humana fueron más pasivos que los precursores tempranos vistos en las muestras de monos cynomolgus. Otros tejidos, incluyendo muestra de sangre periférica, pulmón, músculo esquelético, páncreas, piel, bazo y tiroides mostraron tinción similar entre el mono cynomolgus y muestras humanas.

Para afrontar la tinción nuclear observada en algunas de las secciones, especialmente aquellas en los tejidos de mono cynomolgus, se usaron secciones congeladas en pulmón, piel y tejidos cardiacos de humano y mono cynomolgus a concentraciones de (ch)ARH460-16-2-IgG2 de 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15, 0.08 y 0.04 microgramos/mL para determinar la concentración que retendría la señal primaria y aún reluce el fondo en los tejidos de colágeno y conectivos y también para evaluar la tinción nuclear que estuvo presente en algunos tejidos usados con formalina. Los portaobjetos en esa concentración entonces se compararon a estudios anteriores en tejidos fijados en formalina de los mismos órganos en estas dos especies.

A una concentración de 1.5 microgramos/mL, se redujo de forma sustancial la tinción nuclear tanto en las muestras de tejido fijadas en formalina de humano y primate, y dentro de muestras congeladas, la tinción nuclear estuvo grandemente ausente, sugiriendo fuertemente que la tinción nuclear que estuvo prevalente en los tejidos fijados en formalina fue artifactual y debido a la metodología o un artefacto de fijación. En conclusión, el anticuerpo híbrido (ch)ARH460-16-2-IgG1 reacciona de forma cruzadas con tejidos normales de mono cynomolgus.

Ejemplo 6

Estudio de Competición Cruzada

A fin de caracterizar adicionalmente las propiedades de unión de H460-16-2 y AR37A335.8 (como se describe en la solicitud de patente de los estados unidos No. de serie 11/364,013), los experimentos de competición de anticuerpos se llevaron a cabo por transferencia Western para determinar si H460-16-2 y AR37A335.8 reconocen epítomos similares o distintos de CD44. Se sometieron quinientos microgramos de una preparación de membrana total de MDA-MB-231 a SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras usando peines preparativos de concavidad que abarcaron la longitud completa de cada uno de los dos geles de poliacrilamida de al 10 por ciento. Las proteínas de los geles se transfirieron a las membranas de PVDF a 150V durante 2 horas a 4°C. Las membranas

se bloquearon con leche descremada al 5 por ciento en TBST durante aproximadamente 17 horas a 4°C en una plataforma giratoria. Las membranas se lavaron dos veces con aproximadamente 20 mL de TBST y se colocaron en un aparato de multi-tamiz Western se crea veintidós cales se parados los cuales aplicaron diferentes soluciones de sondeo. DE forma previa, se ha preparado H460-16-2 y AR37A335.8 biotinilados usando el Kit de Biotinilación de Fase Sólida EX-Linc NHS-PEO (Pierce, Rockford, IL). Se prepararon soluciones de anticuerpo primario al mezclar H460-16-2 biotinilado o AR37A335.8 biotinilado con concentraciones variables de anticuerpos no biotinilados. De manera específica, se prepararon soluciones que contienen 1 microgramo/mL de H460-16-2 biotinilado en leche descremada al 3 por ciento en TBST más de 2 microgramos/mL, 10 microgramos/mL, 100 microgramos/mL, 500 microgramos/mL o 10000 microgramos/mL de anticuerpo no biotinilado. Los anticuerpos no biotinilados que se usaron fueron H460-16-2, AR37A335.8 y el anticuerpo de control 1B7.11 (control de isotipo, IgG1 murina anti-TNP, purificado en laboratorio). Se prepararon soluciones que contienen 1 microgramo/mL de AR37A335.8 biotinilado con las mismas concentraciones listadas anteriormente de los anticuerpos no biotinilados AR37A335.8, H460-16-2 y el anticuerpo de control 8B1B.1 (control de isotipo, IgG2b murina anti-virus del lengua azul, purificado en

laboratorio).

Las soluciones de anticuerpo primario se incubaron en canales se parados en las membranas durante 2 horas a temperatura ambiente en una plataforma mecedora. Cada canal se lavó 3 veces con TBST durante 10 minutos en una plataforma mecedora. La solución secundaria de 0.01 microgramos/mL de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) en leche descremada al 3 por ciento en TBST se aplicó a cada canal en la membrana. Las membranas se incubaron en solución secundaria durante 1 hora a temperatura ambiente en una plataforma mecedora. Cada canal se lavó 3 veces con TBST durante 10 minutos en una plataforma mecedora. Las membranas se removieron del aparato de multitamiz y se incubaron con una solución mejorada de detección de quimioluminiscencia (GE Healthcare, Life, Sciences anteriormente Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las membranas entonces expusieron la película y se revelaron.

La Figura 11 y la figura 12 muestran los resultados de los experimentos de competición de anticuerpos. La unión de H460-16-2 biotinilados se inhibió completamente cuando se mezcla con H460-16-2 no biotinilado a concentraciones de 100 microgramos/mL, y mayores (exceso de 100X; Figura 11, panel A, sendas 1-5) en tanto que la unión de AR37A335.8

biotinilado se inhibió completamente cuando se mezcló con AR37A335.8 no biotinilado a concentraciones de 10 microgramos/mL y mayores (exceso de X; Figura 12, Panel B, sendas 6-10). La unión de H460-16-2 biotinilado no se inhibió en cualquiera de las muestras que contienen el anticuerpo de control de isotipo de IgG1 (Figura 11, Panel C, sendas 11-15) y la unión de AR37A335.8 biotinilado no se inhibió en ninguna de las muestras que contienen el anticuerpo de control de isotipo de IgG2b (Figura 12, Panel C, sendas 11-15). Esto indica que la inhibición de la unión observada con los anticuerpos biotinilados mezclados con el mismo anticuerpo no biotinilado fue debido a la ocupación de los sitios de unión a antígeno con el anticuerpo no biotinilado, no por las interacciones no específicas del anticuerpo en exceso solo. La unión de AR37A335.8 biotinilado se inhibió completamente cuando se mezcló con H460-16-2 no biotinilado a concentraciones de 500 microgramos/mL y mayores (exceso 500X; Figura 12, Panel A, sendas 1-5), y la unión de H460-16-2 biotinilado se inhibió completamente cuando se mezcló con AR37A335.8 no biotinilado a todas las concentraciones probadas (Figura 11, Panel B, sendas 6-10). Estos resultados indican que la unión de H460-16-2 impide la unión de AR37A335.8 y viceversa. En conjunto, los resultados de las transferencias Western de competición sugieren que los epítomos de la molécula CD44 que se reconocen por H460-16-2 y

AR37A335.8 son ya sea idénticos o espacialmente muy cercanos entre sí, tal que la unión de un anticuerpo puede bloquear completamente la unión del otro anticuerpo.

Ejemplo 7

Determinación de la afinidad de unión de AR37A335.8 a rhCD44

Se determinó la afinidad de unión de AR37A335.8 a CD44 recombinante (rhCD44) por resonancia de plasmón superficial (SPR).

El CD44 humano recombinante/Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) se inmovilizó usando un procedimiento normal de acoplamiento con amina. La superficie de un chip sensor CM5 (GE Healthcare, Piscataway, NJ EUA, anteriormente Biacore) se activó por inyección de 104 microlitros de una mezcla 1:1 de EDC 0.4 M y NHS 0.1 M (velocidad de flujo 10 microlitros/minuto). El rhCD44 se inyectó a una concentración de 20 microgramos/mL (diluido en acetato de sodio 10 mM, pH 5.5) para alcanzar aproximadamente 500 RU. Finalmente, se inyectaron 119 microlitros de etanolamina-HCl 1.0 M, pH 8.5 sobre la superficie para bloquear cualquier sitio activado no ocupado en la superficie del chip sensor. Se inyectaron concentraciones variables del anticuerpo AR37A335.8. La regeneración de la superficie del chip sensor para inyecciones subsiguientes se acompañó por inyección de glicina-HCl 10 mM, pH 2.0 durante 70 segundos a una velocidad de flujo de 50 microlitros/minutos. Se diluyeron anticuerpos

en amortiguador de corrida (HBS-EP + GE Healthcare, Piscataway, NJ EUA anteriormente Biacore) y se inyectaron en serie a concentraciones que varían desde 0.67 a 667 nM y las superficies se regeneró entre cada sitio. Como un control, cada concentración de anticuerpo también se inyectó sobre una superficie de referencia que no tiene rh CD44 inmovilizado en la superficie. Usando el Software de Evaluación T100 Biacore, Versión 1.1, se realizó el análisis cinético en los sensogramas obtenidos usando un modelo simple de interacción 1:1. La constante de asociación y disociación se usaron para calcular la KD de los anticuerpos. Los experimentos se llevaron a cabo usando un sistema Biacore T100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ EUA anteriormente Biacore). Los resultados de este experimento produjeron una KD de 0.09425 nM para AR37A335.8. (Figura 13). Estos resultados indican que AR37A335.8 tiene una KD en el intervalo sub-nanomolar y que la afinidad de AR37A335.8 es mayor que aquella de H460-16-2 (referidas al Ejemplo 10 posterior). Las constantes de asociación (Ka, por sus siglas en inglés) y las constantes de disociación (kd, por sus siglas en inglés) también se tabularon (Figura 13).

Ejemplo 8

Transferencias de Perfilador de Proteoma de Fosfo-RTK (Receptor-Tirosina-Cinasa)

Para identificar las rutas de señalización

intracelular afectadas por el tratamiento con (ch)ARH460-16-2-IgG1 híbrido, se examinaron lisados de células tratadas con (ch)ARH460-16-2-IgG1 usando un arreglo de anticuerpo de fosfo-RTK humano de perfilador de proteoma (ARY001, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN).

Tratamiento y preparación de células

El trabajo anterior (como se describe en la solicitud de patente de los estados unidos No. de serie 11/364,013) demostró eficiencia *in vivo* de (ch)ARH460-16-2-IgG1 en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama usando células de cáncer de mama MDA-MB-231 cultivadas en ratones inmunodeficientes, combinados, severos (SCID, por sus siglas en inglés). Por consiguiente, se realizó el examen para la activación de moléculas de señalización intracelular usando la línea de células MDA-MB-231. Las células MDA-MB-231 se cultivaron a casi confluencia, se lavaron con solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y luego se ayunaron en suero y medio deficiente de complemento durante la noche a 37°C. Después de esto, se adicionaron (ch)ARH460-16-2-IgG1 (20 microgramos/mL) o IgG1 humana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) (20 microgramos/mL) a las células y se dejaron unir durante 20 minutos a 4°C. Entonces las células se estimularon al adicionar suero bovino fetal (FBS), L-glutamina y piruvato de sodio a células para dar una concentración final de 10 por ciento de FBS, 1 por ciento de L-glutamina y 1 por ciento de

piruvato de sodio. Las células se colocaron en una incubadora a 37°C y el lisado celular se colectó 1 hora después de la estimulación. Los lisados se recolectaron al lavar las células 2 veces con PBS y al recolectar en amortiguador de lisis NP-40 (Tris-HCl 20 mM (pH 8.0), cloruro de sodio 137 mM, Glicerol al 10 por ciento, EDTA 2 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, 10 microgramos/mL de Aprotinina, 10 microgramos/mL de Leupeptina, 1 por ciento de NP-40 (Igepal^{MR} CA-630, Sigma-Aldrich, St, Louis, MI). Las células se resuspendieron por pipeta, se transfirieron a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL se mezclaron por rotación a 4°C durante 30 minutos. Los lisados se centrifugaron luego a 14000xg durante cinco minutos y el sobrenadante se transfirió a tubo. Se determinaron por el ensayo de proteína de ácido bicinconínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL).

Arreglo de anticuerpo de fosfo-RTK humano

El arreglo de anticuerpo de fosfo-RTK humano se examinó con lisados de células MDA-MB-231 de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante (tercera revisión, noviembre de 2005, arreglo de anticuerpo ARY001 de R&D Systems). De forma breve, cada membrana de perfilador de fosfo-RTK humano se preparó al incubar en 1.5 mL de amortiguador 1 de arreglo (parte número 895477: arreglo de anticuerpo ARY001 de R&D Systems) durante 1 hora en un agitador de plataforma mecedora. Para cada tratamiento, se

diluyeron 150 microgramos de proteína total con el amortiguador 1 de arreglo a un volumen total de 1.5 mL. Esta mezcla se adicionó a las membranas de perfilador preparadas y se incubó a 4°C durante la noche en un agitador de plataforma mecedora. Cada membrana entonces se lavó 3 veces en amortiguador de lavado 1X (diluido en agua destilada purificada de una solución concentrada 25X (parte número 895003: arreglo de anticuerpo ARY001 de R&D Systems)) y se incubó durante 2 horas con 1.5 mL del coctel de anticuerpo de detección anti-fosfo-tirosina-HRP (parte número 841403: arreglo de anticuerpo ARY001 de R&D Systems) diluido en amortiguador 2 de arreglo 1X (amortiguador 2 de arreglo 5X, parte número 895478: arreglo de anticuerpo ARY001 de R&D Systems). Las membranas se lavaron 3 veces en amortiguador de lavado 1X y se expusieron a reactivos de detección ECL plus Western (GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, NJ) para el revelado. Las membranas expusieron la película quimioluminiscente (Kodak, Cedex, Francia) y se revelaron usando un procesador médico de rayos X. Los datos del arreglo de fosfo-RTK en las películas reveladas de rayos X se cuantificaron al explorar la película en un escáner de modo de transmisión y al analizar el archivo de imagen del arreglo usando el software de análisis Image J (Image J 1.37v, NIH). Para cada RTK, se calculó la densidad media de pixeles para los correspondientes puntos duplicados, y se sustrajo de la

señal de fondo usando la densidad de pixeles de un área clara en la membrana. La densidad promedio normalizada de pixeles de muestras tratadas con (ch)ARH460-16-2-IgG1 se dividió por la densidad promedio normalizada de pixeles de las muestras tratadas con IgG1 humana de control de isotipo para cada objetivo de fosfo-proteína correspondiente para obtener una relación de cambio relativo. El por ciento de reducción de la señal de fosfo-proteína se determinó al sustraer la relación del cambio relativo de 1 y multiplicando por 100.

Los resultados del arreglo de fosfo-RTK incubado con (ch)ARH460-16-2-IgG1 se muestran en la Figura 14. En comparación con el control de isotipo, el tratamiento con (ch)ARH460-16-2-IgG1 indujo una reducción en la fosforilación de la RTK-tirosina-cinasa con dominios 1 tipo insulina y tipo EGF similar a inmunoglobulina (Tie-1) (aproximadamente 51 por ciento). Tie-1 junto con Tie-2 forman el receptor para angiopoyetinas, factores de crecimiento que promueven la angiogénesis. La unión de las angiopoyetinas a su receptor induce fosforilación de Tie-1 y Tie-2 y el inicio de la señalización celular que promueve el crecimiento celular. Que (ch)ARH460-16-2-IgG1 pueda reducir la fosforilación de Tie-1 en la estimulación por suero y complementos sugiere que (ch)ARH460-16-2-IgG1 puede bloquear la inducción del factor de crecimiento de la diferenciación celular y el progreso tumoral a través de la activación del complejo de

angiopoyetina/ligando de receptor de Tie-1/2.

Ejemplo 9

Humanización de H460-16-2

Se realizaron técnicas de ADN recombinante usando métodos bien conocidos en la técnica, y como es apropiado, instrucciones del proveedor para el uso de enzimas usadas en estos métodos. También se describen a continuación métodos detallados de laboratorio.

Se extrajo el ADNm de las células de hibridoma H460-16-2 usando un kit de extracción de ADNm Poly A Tract System 1000: (Promega Corp., Madison, WI) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARNm se transcribió inverso como sigue. Para la cadena ligera kappa, se mezclaron 5.0 microlitros de ARNm con 1.0 microlitro de 20 pmol/microlitro de cebador OL040 de MulgG $\square$ V_L-3' (Figura 15) y 5.5 microlitros de agua libre de nucleasa (Promega Corp., Madison, WI). Para la cadena ligera lambda, se mezclaron 5.0 microlitros de ADNm con 1.0 microlitro de 20 pmol/microlitro de cebador OL042 de MulgG $\square$ V_L-3' (Figura 15) y 5.5 microlitros de agua libre de nucleasa (Promega Corp., Madison, WI). Para la cadena pesada gamma, se mezclaron 5 microlitros de ARNm con 1.0 microlitro de 20 pmol/microlitro de cebador OL023 de MulgG $\square$ V_H-3' (Figura 16) y 5.5 microlitros de agua libre de nucleasa (Promega Corp., Madison, WI). Las tres mezclas de reacción se colocaron en el bloque precalentado del ciclador térmico

ajustado 70°C durante 5 minutos. Estas se enfriaron en hielo durante 5 minutos antes de adicionar a cada 4.0 microlitros de amortiguador de reacción ImPromII 5x (Promega Corp., Madison, WI), 0.5 microlitros de inhibidor de ribonucleasa RNasir (Promega Corp., Madison, WI), 2.0 microlitros de $MgCl_2$ 25 mM (Promega Corp., Madison, WI), 1.0 microlitros de mezcla dNTP 10 mM (Invitrogen, Paisley, RU) y 1.0 microlitros de transcriptasa inversa Improm II (Promega Corp., Madison, WI). Las mezclas de reacción se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de que se transfirieran a un bloque de PCR pre-calentado ajustado a 42°C durante 1 hora. Después de este tiempo, la transcriptasa inversa se inactivó con calor al incubar a 70°C en un bloque de PCR durante 15 minutos.

Se amplificaron las secuencias de cadena pesada y ligera del ADNc como sigue. Se preparó una mezcla principal de PCR al adicionar 37.5 microlitros de amortiguador de PCR 10x Hi-Fi Expand (Roche, Mannheim, Alemania), 7.5 microlitros de mezcla dNTP 10 mM (Invitrogen, Paisley, RU) y 3.75 microlitros de ADN-polimerasa Hi-Fi Expand (Roche, Mannheim, Alemania) a 273.75 microlitros de agua libre de nucleasa. Esta mezcla principal se distribuyó en alícuotas de 21.5 microlitros en 15 tubos de reacción de PCR de pared delgada en hielo. En seis de estos tubos se adicionaron 2.5 microlitros de la mezcla de reacción de transcripción inversa MulgVH-3' y 1.0 microlitros de las mezclas HA a HF del

cebador 5' de cadena pesada (ver Figura 16 para secuencias cebadoras y constituyentes de mezcla de cebadores). A los otros siete tubos se adicionaron 2.5 microlitros de la reacción de transcripción inversa MulgKLV-3' y 1.0 microlitros de las mezclas LA a LG de cebador 5' de cadena ligera (Figura 15). En el tubo final, se adicionaron 2.5 microlitros de la reacción de transcripción inversa MulgKLV-3' y 1.0 microlitros de cebador de cadena ligera lambda Mulg λ VL5'-LI. Las reacciones se colocaron en el bloque del ciclador térmico y se calentaron a 95°C durante 2 minutos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó durante 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 30 segundos. Finalmente, los productos de PCR se calentaron a 72°C durante 5 minutos, y luego se mantuvieron a 4°C.

Los productos de amplificación se clonaron en el vector pGEM-T usando el kit pGEM-T easy Vector System I (Promega Corp., Madison, WI) y se secuenciaron. Las secuencias de VH y VL resultantes se muestran en las Figuras 17 y 18, respectivamente.

Para la generación de un anticuerpo híbrido, los genes de la región VH se amplificaron por PCR usando los cebadores OL437 y OL438 (Figura 19); estos se diseñan para manejarse en un sitio de enzima de restricción 5' MluI y 3' HindIII usando el ADN de plásmido de uno de los clones de

ADNc como una plantilla. En un tubo de PCR de 0.5 mL se adicionaron 5 microlitros de amortiguador de PCR 10X Hi-Fi Expand: (Roche, Mannheim, Alemania), 1.0 microlitros de mezcla dNTP 10 mM (Invitrogen, Paisley, RU), 0.5 microlitros del Cebador OL437, 0.5 microlitros del cebador OL438, 1.0 microlitro de ADN de plantilla y 0.5 microlitros de ADN-polimerasa Hi-Fi Expand (Roche, Mannheim, Alemania) a 41.5 microlitros de agua libre de nucleasa.

Se amplificaron las regiones de VL en un método similar usando los oligonucleótidos OL439 y OL090 (Figura 20) para manejarse en sitios de enzimas de restricción BssHII y BamHI. Las reacciones se colocaron en el bloque del ciclador térmico y se calentaron a 95°C durante 2 minutos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se realizó durante 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto y 72°C durante 30 segundos. Finalmente, los productos de PCR se calentaron a 72°C durante 5 minutos, y luego se mantuvieron a 4°C. Entonces se clonaron los productos de PCR de la región VH y VL en el vector dual pANT18 (Figura 21) y en los sitios MluI/HindIII y BssHII/BamHI, respectivamente.

El pANT18 es un plásmido basado en pAT153 que contiene un casete de expresión de cadena ligera y pesada de Ig humana y un gen de selección de dhfr. El casete de cadena pesada consiste de un gen de región constante de IgG1

genómico humano activado por el promotor hCMVie con una región polyA de IgG humana en dirección 3'. El casete de cadena ligera está comprendido de la región constante kappa humana genómica accionada por el promotor hCMVie con una región polyA de cadena ligera en dirección 3'. Los sitios de clonación entre una secuencia guía de Ig humana y las regiones constantes permiten la inserción de los genes de región variable. pANT18 también contiene un gen dhfr de hámster activado por el promotor SV40 con una región polyA de SV40 en la dirección 3'.

Los genes de la región V humanizada se construyeron usando las plantillas de VH y VL de H460-16-2 de ratón para PCR usando oligonucleótidos de traslape largo para introducir aminoácidos de secuencias de VH y VL humanas homólogas. En las tablas 19 y 20 se muestran respectivamente los oligonucleótidos usados para la generación de secuencias de VH y VL humanizadas variantes. Las variantes humanizadas también se clonaron directamente en el vector de expresión pANT18. Las secuencias para las variantes VH y VL humanizadas se muestran en las Figuras 22 y 23, respectivamente.

El (ch)ARH460-16-2 (VK0VH0) híbrido resultante, y las construcciones humanizadas se transfectan en células CHO/dhfr (ECACC, 94060607) por electroporación y se seleccionaron en medios (DMEM de alta glucosa con L-glutamina

y pivurato de sodio (Invitrogen, Paisley, RU) más 5 por ciento de FBS dializado (Cat No. 26400-044 Invitrogen, Paisley, RU), prolina (Sigma, Poole, RU) y penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Paisley, RU) agotado de hipoxantina y timidina. Las colonias se seleccionaron en base a los niveles de IgG humana segregada en el medio como se mide por el ELISA de captura de IgG1 humana/kappa descrito más adelante. Las colonias seleccionadas se expandieron y los anticuerpos se purificaron de los sobrenadantes de cultivo celular por cromatografía de afinidad de proteína A usando una columna HiTrap MabSelect SuRe de 1 mL (GE Healthcare, Amersham, RU) siguiendo las condiciones recomendadas por los fabricantes. Los anticuerpos purificados se esterilizaron en filtro antes del almacenamiento (en PBS, pH 7.4) a +4°C.

Las concentraciones de los anticuerpos se calcularon por el ELISA de captura de hIgG1/kappa usando el IgG1/kappa humana purificada (Sigma, Poole, RU) como normas. Se revistieron placas de 96 concavidades Immunosorb (Nalge nunc, Hereford, RU) con anticuerpo específico de Fc anti-IgG humana (16260 Sigma, Poole, RU) diluido a 1:1500 en 1X PBS (pH 7.4) a 37°C durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces en PBS más Tween 20 al 0.05 por ciento antes de adicionar las muestras y normas, se diluyó en BSA/PBS al 2 por ciento. Las placas se incubaron a temperatura ambiente

durante 1 hora antes de lavar tres veces en PBS/Tween y adicionando 100 microlitros/concavidad del anticuerpo de detección, conjugado de peroxidasa anti-cadena ligera kappa humana de cabra (A7164 Sigma, Poole, RU) diluido 1:1000 en BSA/PBS al 2 por ciento. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora antes de lavar tres veces con PBS/tween y el anticuerpo unido se detectó usando el sustrato OPD (Sigma, Poole, RU). El ensayo se reveló en la oscuridad durante 5 minutos antes de que se detenga por la adición de HCl 3 M. La placa de ensayo entonces se leyó en un lector de placa MRX TCII (Dynex Technologies, Worthing, RU) a 490 nm.

El (ch)ARH460-16-2 (VK0VH0) quimérico y los anticuerpos variantes humanizados se probaron en un ensayo de competición basado en ELISA usando el anticuerpo de ratón H460-16-2, se biotiniló usando el kit de biotinilación Biotintag micro (Sigma, Poole, RU). El H460-16-2 biotinilado de ratón se usó para unirse a CD44 humano recombinante (R&D systems, Abingdon, RU) en la presencia de concentraciones variables del anticuerpo competidor. El CD44 humano recombinante se inmovilizó en placas de microtítulo de 96 concavidades Immunosorb 96 (Nalge nunc, Hereford, RU) a 5 microgramos/mL en amortiguador de carbonato 0.05 M, pH 9.0 (Sigma, Poole, RU) a +4°C durante la noche. El anticuerpo H460-16-2 biotinilado de ratón se diluyó a 0.2 microgramos/mL

y se mezcló con volúmenes iguales de anticuerpo competidor a concentraciones que varían desde 0-20 microgramos/mL. Las placas de CD44 se lavaron tres veces en PBS más Tween 20 al 0.05 por ciento. Se transfirieron 100 microlitros de las mezclas de anticuerpo en las concavidades de la placa revestida con CD44 y esto se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó, y el H460-16-2 de ratón biotinilado unido se detectó al adicionar un conjugado de estreptavidina-HRP (Sigma, Poole, RU) (diluido a 1:500) y sustrato de TMB (Sigma, Poole, RU). El ensayo se reveló en la oscuridad durante 5 minutos antes de que se detuviera por la adición de HCl 3 M. La placa de ensayo entonces se leyó en un lector de placa MRX TCII (Dynex Technologies, Worthing, RU) a una absorbancia de 450 nm. La absorbancia se graficó contra la concentración del anticuerpo de prueba para dar la gráfica mostrada en la Figura 24. El anticuerpo (ch)ARH460-16-2 (VK0VH0) híbrido y dos variantes humanizadas se muestran que son equivalentes al anticuerpo H460-16-2 de ratón en la competición con el anticuerpo H460-16-2 biotinilado para la unión a CD44 recombinante.

Ejemplo 10

Determinación de la Afinidad de Unión de H460-16-2 Murino y Variantes de (hu)ARH460-16-2 a rhCD44

La afinidad de unión de H460-16-2, (hu)ARH460-16-2, variante 1 y (hu)ARH460-16-2, variante 2, se comparó por la

determinación de las constantes respectivas de disociación subsiguiente a la unión a CD44 recombinante (rhCD44).

El CD44 humano recombinante/Fc (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) se inmovilizó usando el procedimiento normal de acoplamiento en amina. La superficie de un chip sensor CM5 (GE Healthcare, Piscataway, NJ EUA anteriormente Biacore) se activó por inyección de 104 microlitros de una mezcla 1:1 de EDC 0.4 M y NHS 0.1 M (velocidad de flujo 10 microlitros/minuto). El rhCD44 se inyectó a una concentración de 20 microgramos/mL (diluido en acetato de sodio 10 mM, pH 5.5) para alcanzar aproximadamente 500 RU. Finalmente, se inyectaron 119 microlitros de etanolamina-HCl, pH 8.5 sobre la superficie para bloquear cualquier sitio activado, desocupado en la superficie del chip sensor. Se inyectaron concentraciones variables de H460-16-2, (hu)ARH460-16-2, variante 1 o (hu)ARH460-16-2, variante 2. La regeneración de la superficie del chip sensor para inyecciones subsiguientes se logró por la inyección de Glicina-HCl 10 mM, pH 2.0 durante 70 segundos a una velocidad de flujo de 50 microlitros/minuto. Los anticuerpos se diluyeron en amortiguador de corrida (HBS-EP+, GE Healthcare, Piscataway, NJ USA, anteriormente Biacore) y se inyectaron en serie a concentraciones que varían desde 0.67 a 667 nM, y la superficie se regeneró entre cada ciclo. Como un control, cada concentración de anticuerpo también se inyectó sobre una

superficie de referencia que no tiene rhCD44 inmovilizado en la superficie. Usando el software de Evaluación Biacore T100 Versión 1.1, se realizó el análisis cinético en los sensogramas obtenidos usando un modelo simple de interacción 1:1. Las constantes de asociación y de disociación se usaron para calcular la KD de los anticuerpos. Los experimentos se llevaron a cabo usando un sistema Biacore T100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ EUA, anteriormente Biacore). El resultado de estos experimentos produjeron valores de 4.19 nM para H460-16-2 murino en tanto que la KD para (hu)ARH460-16-2, variante HV1/KV1 y (hu)ARH460-16-2, variante HV2/KV1 se encontraron que son de 6.32 y 3.17 nM, respectivamente (Figura 25). Estos resultados indican que todos los anticuerpos tienen una KD en el intervalo nanomolar, y que las afinidades de los anticuerpos humanizados son similares a aquélla del H460-16-2 murino parental. Las constantes de asociación (K_a) y las constantes de disociación (K_d) también se tabularon (Figura 25).

Ejemplo 11

Aislamiento de Aglutinantes Competitivos

Dado un anticuerpo, un individuo experto en la técnica puede generar un CDMAB competitivamente inhibidor, por ejemplo un anticuerpo competidor, que es uno que reconoce el mismo epítipo (Belanger L et al. Clinica Chimica Acta 48:15-18 (1973)). Un método conlleva inmunizar con un

inmunógeno que expresa el antígeno reconocido por el anticuerpo. La muestra puede incluir pero no se limita a tejidos, proteínas aisladas o líneas celulares. Los hibridomas resultantes se pueden examinar usando un ensayo de competición, que es uno que identifica los anticuerpos que inhiben la unión del anticuerpo de prueba, tal como ELISA, FACS o transferencia Western. Otro método puede hacer uso de las bibliotecas de anticuerpo de visualización en fago y adsorción de anticuerpos que reconocen al menos un epítipo del antígeno (Rubinstein JL et al., Anal Biochem 314:294-300 (2003)). En cualquier caso, se seleccionan anticuerpos en base a su capacidad para desplazar la unión del anticuerpo original marcado a al menos un epítipo de su antígeno objetivo. Estos anticuerpos por lo tanto poseerán la característica de reconocer al menos un epítipo del antígeno como el anticuerpo original.

Ejemplo 12

Clonación de Regiones Variables del Anticuerpo Monoclonal H460-16-2

Las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) del anticuerpo monoclonal producido por la línea de células de hibridoma H460-16-2 se determinaron de forma anterior (como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 11/364,013). Para generar la IgG híbrida y humanizada, los

dominios pesados variables y ligeros variables se pueden subclonar en un vector apropiado para expresión (como se describe en el Ejemplo 9 anterior).

En otra modalidad, el H460-16-2 o su versión desimmunizada, híbrida o humanizada se produce al expresar un ácido nucleico que codifica para el anticuerpo en un animal transgénico, tal que el anticuerpo se expresa y se puede recuperar. Por ejemplo, el anticuerpo se puede expresar de una manera específica del tejido que facilita la recuperación y purificación. En esta modalidad, un anticuerpo de la invención se expresa en la glándula mamaria para secreción durante la lactación. Los animales transgénicos incluyen, pero no se limitan a, ratones, cabras y conejos.

(i) Anticuerpo Monoclonal

Se aísla fácilmente el ADN que codifica para el anticuerpo monoclonal (como se describe en el Ejemplo 9 anterior) y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, al usar sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales). La célula de hibridoma sirve como una fuente preferida de este ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que entonces se transfectan en células hospedadoras tal como células de *E. coli*, células COS simiescas, células de ovario de hámster Chino (CHO), o

células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, al sustituir la secuencia codificante para dominios constantes de cadena ligera y pesada humana en lugar de las secuencias murinas homólogas. También se pueden preparar anticuerpos quiméricos o híbridos *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteína de síntesis, incluyendo aquéllos que comprenden agentes reticuladores. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o al formar un enlace de tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato.

(ii) Anticuerpo Humanizado

Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en el mismo de una fuente no humana. Estos residuos de aminoácido no humanos frecuentemente se refieren como residuos de "importación", que típicamente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar por el método de Winter y colaboradores al sustituir las CDR de roedor o las secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-

327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1989); revisado en Clark, Immunol. Today 21:397-402 (2000)).

Se puede preparar un anticuerpo humanizado por un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Están comúnmente disponibles modelos tridimensionales de inmunoglobulina y son familiares para aquellos expertos en la técnica. Están disponibles programas de computadora que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias candidatas seleccionadas de inmunoglobulina. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia candidato de inmunoglobulina, es decir, el análisis de residuos que tienen influencia en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar residuos de FR y combinar de la secuencia de consenso y de importación de modo que se logra la característica deseada del anticuerpo, tal como afinidad incrementada para el antígeno objetivo. En general, los residuos de CDR están directa y más sustancialmente comprendidos en la influencia de la unión al antígeno.

(iii) Fragmentos de Anticuerpo

Se han desarrollado varias técnicas para la

producción de fragmentos de anticuerpo. Estos fragmentos se pueden producir por células hospedadoras recombinantes (revisado en Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11:548-557 (1999); Little et al., Immunol. Today 21:364-370 (2000)). Por ejemplo, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos de F(ab')₂ (Carter et al., Biotechnology 10:163-167 (1992)). En otra modalidad, el F(ab')₂ se forma usando la cremallera de leucina GCN4 para promover el montaje de la molécula de F(ab')₂. De acuerdo a otro planteamiento, se pueden aislar los fragmentos Fv, Fab o F(ab')₂ directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes.

Ejemplo 13

Una Composición que Comprende el de la Presente Invención

El anticuerpo de la presente invención se puede usar como una composición para prevenir/tratar cáncer. La composición para prevenir/tratar cáncer, que comprende el anticuerpo de la presente invención, se puede administrar como están en la forma de preparaciones líquidas, o como composiciones farmacéuticas de preparaciones adecuadas a humanos o mamíferos (por ejemplo, ratas, conejos, ovejas, cerdos, bovinos, felinos, caninos, simios, etc.) oralmente o de forma parenteral (por ejemplo, intravascularmente, de manera intraperitoneal, subcutáneamente, etc.). El anticuerpo de la presente invención se puede administrar en

sí mismo, o se puede administrar como una composición apropiada. La composición usada para la administración puede contener un portador farmacológicamente aceptable con el anticuerpo de la presente invención o su sal, un diluyente o excipiente. Esta composición se proporciona en la forma de preparaciones farmacéuticas adecuadas para administración oral o parenteral.

Los ejemplos de la composición para administración parenteral son preparaciones inyectables, supositorios, etc. Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosis tal como inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones de goteadero, inyecciones intraarticulares, etc. Estas preparaciones inyectables se pueden preparar por métodos públicamente conocidos. Por ejemplo, las preparaciones inyectables se pueden preparar al disolver, suspender o emulsionar el anticuerpo de la presente invención o su sal en un medio acuoso estéril o en un medio aceitoso convencionalmente usado para inyecciones. Como el medio acuoso para inyecciones, existen, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución isotónica que contiene glucosa y otros agentes auxiliares, etc., que se pueden usar en combinación con un agente solubilizador apropiado tal como un alcohol (por ejemplo, etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un agente tensioactivo no iónico (por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50

(aducto de polioxietileno (50 moles) de aceite de ricino hidrogenado)), etc. Como el medio aceitoso, se emplean, por ejemplo, aceite de ajonjolí, aceite de soya, etc., que se pueden usar en combinación con un agente solubilizador tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección preparada de esta manera se rellena usualmente en una ampolleta apropiada. El supositorio usado para administración rectal se puede preparar al mezclar el anticuerpo de la presente invención o su sal con bases convencionales para supositorios. La composición para administración oral incluye preparaciones sólidas o líquidas, específicamente, comprimidos (incluyendo grageas y comprimidos revestidos con película), píldoras, gránulos, preparaciones en polvo, cápsulas (incluyendo cápsulas blandas), jarabes, emulsiones, suspensiones, etc. Esta composición se produce por métodos públicamente conocidos y puede contener un vehículo, un diluyente o excipiente convencionalmente usado en el campo de preparaciones farmacéuticas. Los ejemplos del vehículo o excipiente para comprimidos son lactosa, almidón, sacarosa, estearato de magnesio, etc.

De manera ventajosa, las composiciones para uso oral o parenteral descritas en la presente se preparan en preparaciones farmacéuticas con una dosis unitaria adecuada para ajustar una dosis de los ingredientes activos. Estas

preparaciones de dosis unitarias incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas, inyecciones (ampolletas), supositorios, etc. La cantidad del compuesto mencionado anteriormente contenida en general es de 5 a 500 mg por forma de dosis unitaria; se prefiere que el anticuerpo descrito anteriormente esté contenido en aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg, especialmente en la forma de inyección, y en 10 a 250 mg para las otras formas.

La dosis del agente profiláctico/terapéutico mencionado anteriormente, o regulador, que comprende el anticuerpo de la presente invención puede variar dependiendo del sujeto al que se administre, enfermedad objetivo, condiciones, ruta de administración, etc. Por ejemplo, cuando se usa para el propósito de tratar/prevenir, por ejemplo, cáncer de mama en un adulto, es ventajoso administrar el anticuerpo de la presente invención de manera intravenosa en una dosis de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, de manera preferente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal y de manera más preferente de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 1 a 5 veces/día, preferentemente de aproximadamente 1 a 3 veces/día. En otra administración parenteral y oral, el agente se puede administrar en una dosis que corresponde a la dosis dada anteriormente. Cuando

la condición es especialmente severa, la dosis se puede incrementar de acuerdo a la condición.

El anticuerpo de la presente invención se puede administrar como está o en la forma de una composición apropiada. La composición usada para la administración puede contener un portador farmacológicamente aceptable con el anticuerpo mencionado anteriormente o sus sales, un diluyente o excipiente. Esta composición se proporciona en la forma de preparaciones farmacéuticas adecuadas para administración oral o parenteral (por ejemplo, inyección intravascular, inyección subcutánea, etc.). Cada composición descrita anteriormente puede contener además otros ingredientes activos. Además, el anticuerpo de la presente invención se puede usar en combinación con otros fármacos, por ejemplo, agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, etc.), antagonistas metabólicos (por ejemplo, metotrexato, 5-fluorouracilo, etc.), antibióticos anti-tumor (por ejemplo, mitomicina, adriamicina, etc.), agentes anti-tumor derivados de planta (por ejemplo, vincristina, vindesina, Taxol, etc.), cisplatina, carboplatina, etopósido, irinotecan, etc. El anticuerpo de la presente invención y los fármacos descritos anteriormente se pueden administrar simultáneamente o en tiempos escalonados al paciente.

El método de tratamiento descrito en la presente, particularmente para cánceres, también se puede llevar a cabo

con la administración de otros anticuerpos o agentes quimioterapéuticos. Por ejemplo, un anticuerpo contra EGFR, tal como ERBITUX^{MR} (cetuximab), también se puede administrar, particularmente cuando se trata cáncer de colon. También se ha mostrado que ERBITUX^{MR} es efectivo para tratamiento de psoriasis. Otros anticuerpos para uso de combinación incluyen Herceptin^{MR} (trastuzumab) particularmente cuando se trata cáncer de mama, AVASTIN^{MR} particularmente cuando se trata cáncer de colon y SGN-15 particularmente cuando se trata cáncer pulmonar no microcítico. La administración del anticuerpo de la presente invención con otros anticuerpos/agentes quimioterapéuticos puede presentarse de forma simultánea, o de manera separada, mediante la misma o diferente ruta.

Los regímenes de agente quimioterapéutico/otro anticuerpo utilizados incluyen cualquier régimen que se cree que sea óptimamente adecuado para el tratamiento de la condición del paciente. Las diferentes malignidades pueden requerir el uso de anticuerpos anti-tumor específicos y agentes quimioterapéuticos específicos, que se determinará en una base de paciente por paciente. En una modalidad preferida de la invención, la quimioterapia se administra concurrentemente con, o de manera preferente, subsiguiente a la terapia con anticuerpos. Sin embargo, se debe enfatizar que la presente invención

no se limita a ningún método particular ni ruta de administración.

La preponderancia de evidencia muestra que H460-16-2, (ch)ARH460-16-2-IgG2 y (ch)ARH460-16-2-IgG1 median efectos anti-cáncer a través de la ligación de epítomos presentes en CD44. Anteriormente se ha mostrado, (como se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos número de serie 10/647,818, ahora patente de los Estados Unidos número 7,189,397), que el anticuerpo H460-16-2 se puede usar para inmunoprecipitar el antígeno cognado de células que lo expresan tal como células MDA-MB-231. Además, se puede mostrar que H460-16-2, (ch)ARH460-16-2-IgG2, (ch)ARH460-16-2-IgG1, (ch)ARH460-16-2 (VK0VH0) o variantes humanizadas, (hu)ARH460-16-2 se pueden usar en la detección de células y/o tejidos que expresan una porción antigénica de CD44 que se une de manera específica a esto, utilizando técnicas ilustradas por, pero no limitadas a, FACS, ELISA celular o IHC.

Como con el anticuerpo H460-16-2, se pueden usar otros anticuerpos anti-CD44 para inmunoprecipitar y aislar otras formas del antígeno CD44, y el antígeno también se puede usar para inhibir la unión de estos anticuerpos a las células o tejidos que expresan el antígeno usando los mismos tipos de ensayos.

SEQ ID NO

	SEQ ID NO	Secuencia
CDR1 pesada	1	RYWMS
CDR2 pesada	2	EVNPDSTSINYTPSLKD
CDR3 pesada	3	PNYYGSRYHYYAMDY
CDR1 ligera	4	RASQDINNYLN
CDR2 ligera	5	YRSRLHS
CDR3 ligera	6	QQGSTLPFT
HV1	7	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFDfsRYWMSW VRWAPGKGLVWVGEVNPd STSINYTPSLKDRFTISRd NAKNTLYLWMNSLRAEDT AVYYCTRPNYYGSRYHYY AMDYWGQGTLVTVSS
KV1	8	DIQMTWSPSSLSASVGDRV TITCRASQDINNYLNWYQ QKFGKAPKLLIYYTSRLHS GVPSRFSGSGSGTDFtFTI SSLQPEDiatYYCQQGSTL PFTFGQGTKLEIK
HV2	9	EVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCATSGFDfsRYWMSW VRQAPGKGLVWIGEVNPd STSINYTPSLKDQFTISRd NADNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCTRPNYYGSRYHYY AMDYWGQGTLVTVSS

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en

esta especificación son indicativas de los niveles de aquellos expertos en la técnica a la cual corresponde la invención. Todas las patentes y publicaciones se incorporan en la presente como referencia al mismo grado como si cada publicación individual se indicara de manera específica e individual para que se incorpore por referencia.

Se va a entender que tanto que se ilustra una cierta forma de la invención, no se debe limitar a la forma o arreglo específico de las partes descritas en la presente y mostradas en la presente. Será evidente para aquellos expertos en la técnica que se pueden hacer varios cambios sin apartarse del alcance de la invención y que la invención no se va a considerar limitada a lo que se muestra y describe en la especificación. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y para lograr los fines y ventajas mencionadas, así como aquellas inherentes en la misma. Cualquiera de los oligonucleótidos, péptidos, polipéptidos, compuestos biológicamente relacionados, métodos, procedimientos y técnicas descritas en la presente son actualmente representativas de las modalidades preferidas, se propone que sean de ejemplo y no se proponen como limitaciones del alcance. Los cambios en la presente y otros usos se presentarán para aquellos expertos en la técnica que se abarcan dentro del espíritu de la invención y se definen

por el alcance de las reivindicaciones anexas. Aunque la invención se ha descrito en unión con modalidades específicas preferidas, se debe entender que la invención como se reivindica no se debe limitar indebidamente a estas modalidades específicas. En realidad, las varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para aquellos expertos en la técnica se proponen que estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo humanizado que se une específicamente al mismo epítopo o epítopos de CD44 humano como el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma H460-16-2 que tiene el acceso ATCC No. PTA-4621, caracterizado porque comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de amino ácidos de la región determinante de complementariedad de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3; una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de amino ácidos de la región determinante de complementariedad de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO:6; o un fragmento de unión a CD44 humano del mismo.

2. Anticuerpo humanizado que se une específicamente al mismo epítopo o epítopos de CD44 humano como el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma H460-16-2 que tiene el acceso ATCC No. PTA-4621, caracterizado porque comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de amino ácidos de la región determinante de complementariedad de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3; y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de amino ácidos de la región determinante de complementariedad de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO:6.

NO:6; y las regiones estructurales de dominio variable de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo humano o una región menos variable de consenso de anticuerpo humano; o un fragmento de unión a CD44 humano del mismo.

3. Una composición que comprende en combinación:

un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a CD44 humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2;

un conjugado de dicho anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo con un miembro seleccionado del grupo que consiste de porciones citotóxicas, enzimas, compuestos radiactivos, citocinas, interferones, porciones objetivo o indicadoras y células hematógenas; y
una cantidad necesaria de un portador farmacéuticamente aceptable.

4. Una composición que comprende en combinación un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a CD44 humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 y una cantidad necesaria de un portador farmacéuticamente aceptable.

5. Una composición que comprende en combinación:

un conjugado de un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión a CD44 humano de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 con un miembro seleccionado del grupo que consiste de porciones citotóxicas, enzimas, compuestos

radiactivos, citocinas, interferones, porciones objetivo o indicadoras y células hematógenas; y,

una cantidad necesaria de un portador farmacéuticamente aceptable.

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 09-135.216A (22) Fecha de solicitud: 26-11-09		(51) Int Cl: C07K 16/30 (71) Solicitante(s) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 11/807,887	(32) Fecha 30-05-07	(33) País US
		(72) Inventor(es) YOUNG, David, S. F.; FINDLAY, Helen, P.; HAHN, Susan, E.; CECETTO, Lisa, M. y McCONKEY, Fortunata. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 30-12-09 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 23/05/08 No. de solicitud PCT/CA2008/000978		(87) Publicación internacional Fecha: 04/12/08 N° publicación: WO 2008/144890 A1	
(54) Título: "ANTICUERPOS ANTI-CD44 QUIMÉRICOS Y HUMANIZADOS QUE MEDIAN LA CITOTOXICIDAD DE CÉLULAS DE CÁNCER".			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

Anticuerpo humanizado que se une específicamente al mismo epítopo o epítopos de CD44 humano como el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma H460-16-2 que tiene el acceso ATCC No. PTA-4621, caracterizado porque comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de amino ácidos de la región determinante de complementariedad de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3; y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de amino ácidos de la región determinante de complementariedad de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO:6; o un fragmento de unión a CD44 humano del mismo.

FIGURA 1

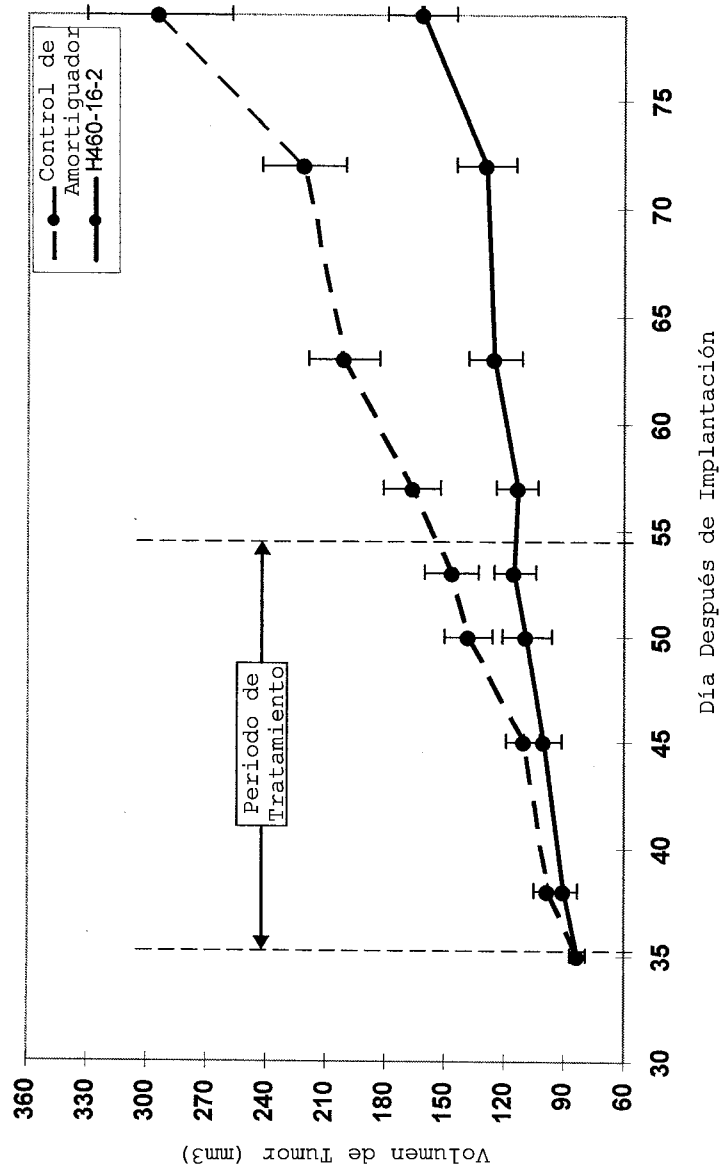


FIGURA 2

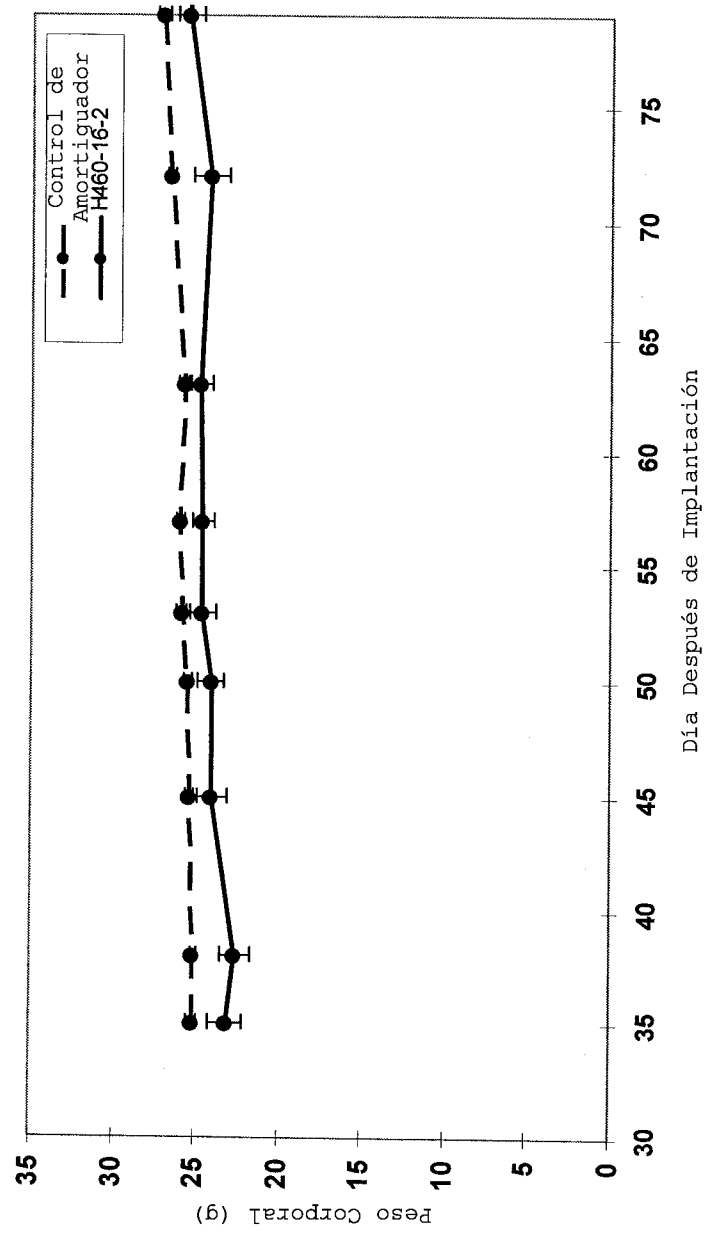


FIGURA 3

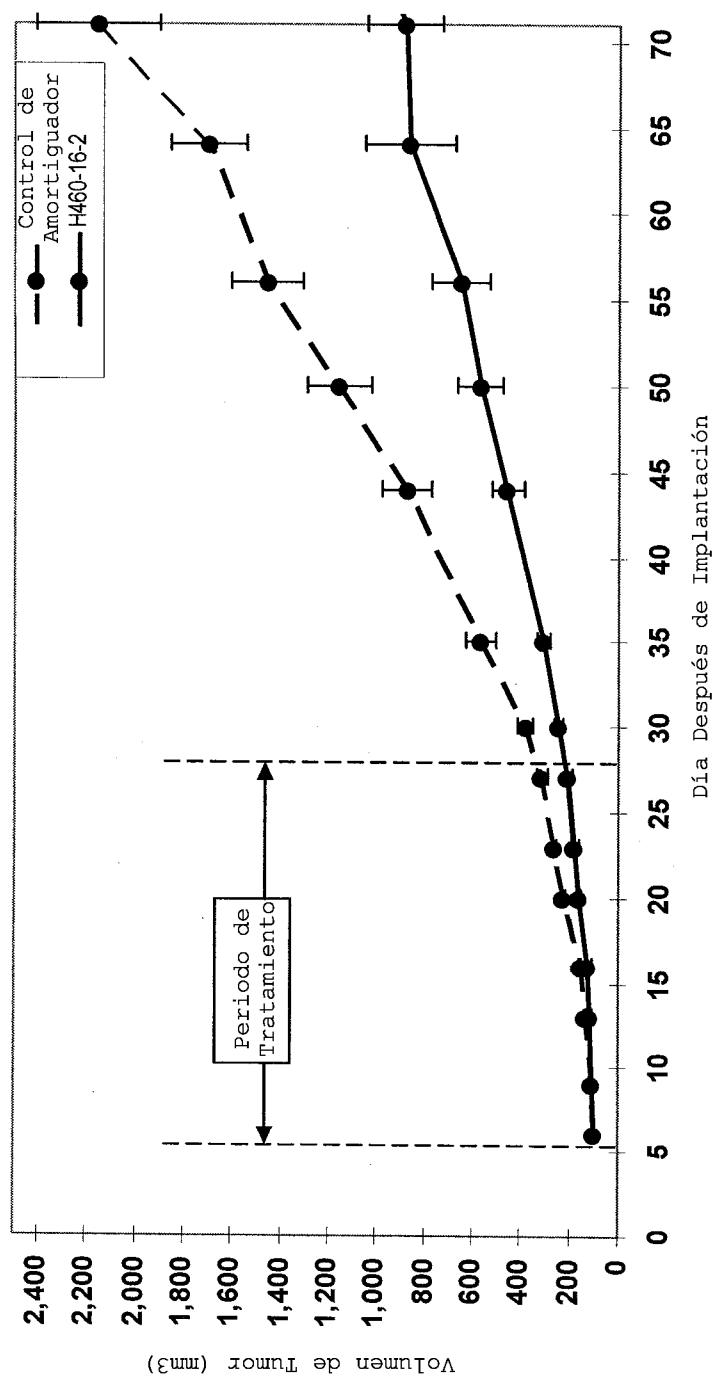


FIGURA 4

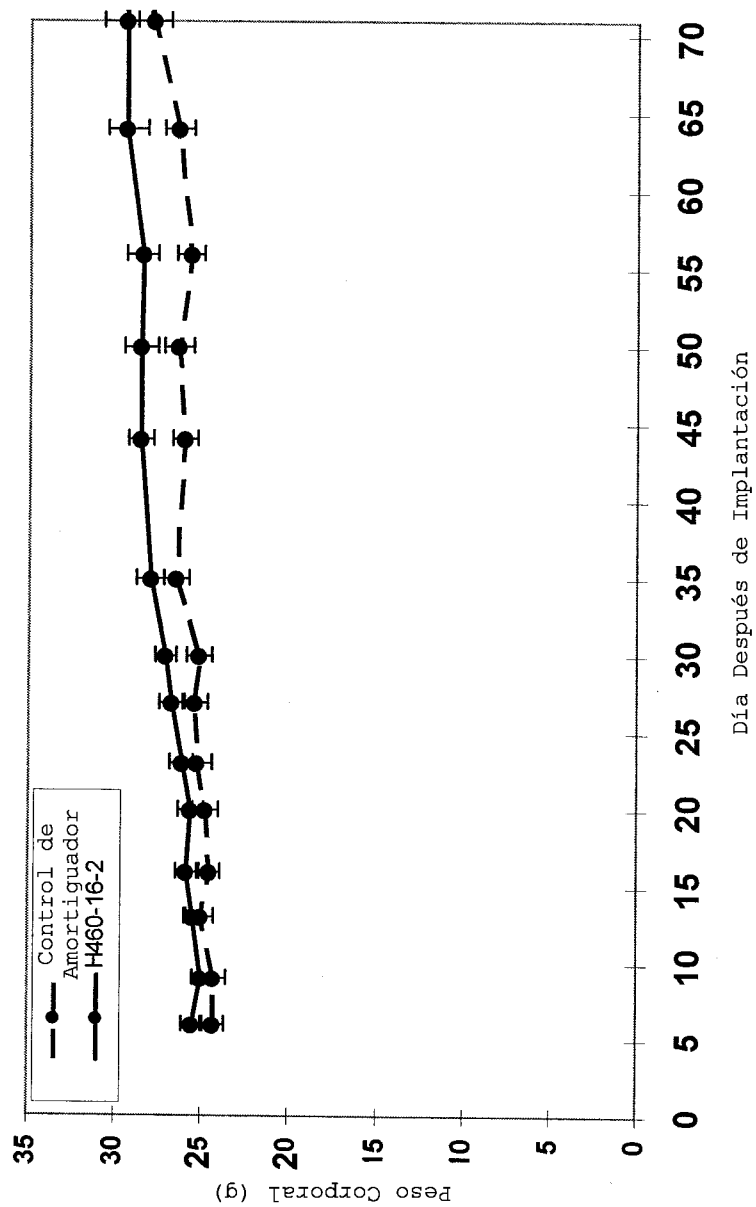


FIGURA 5

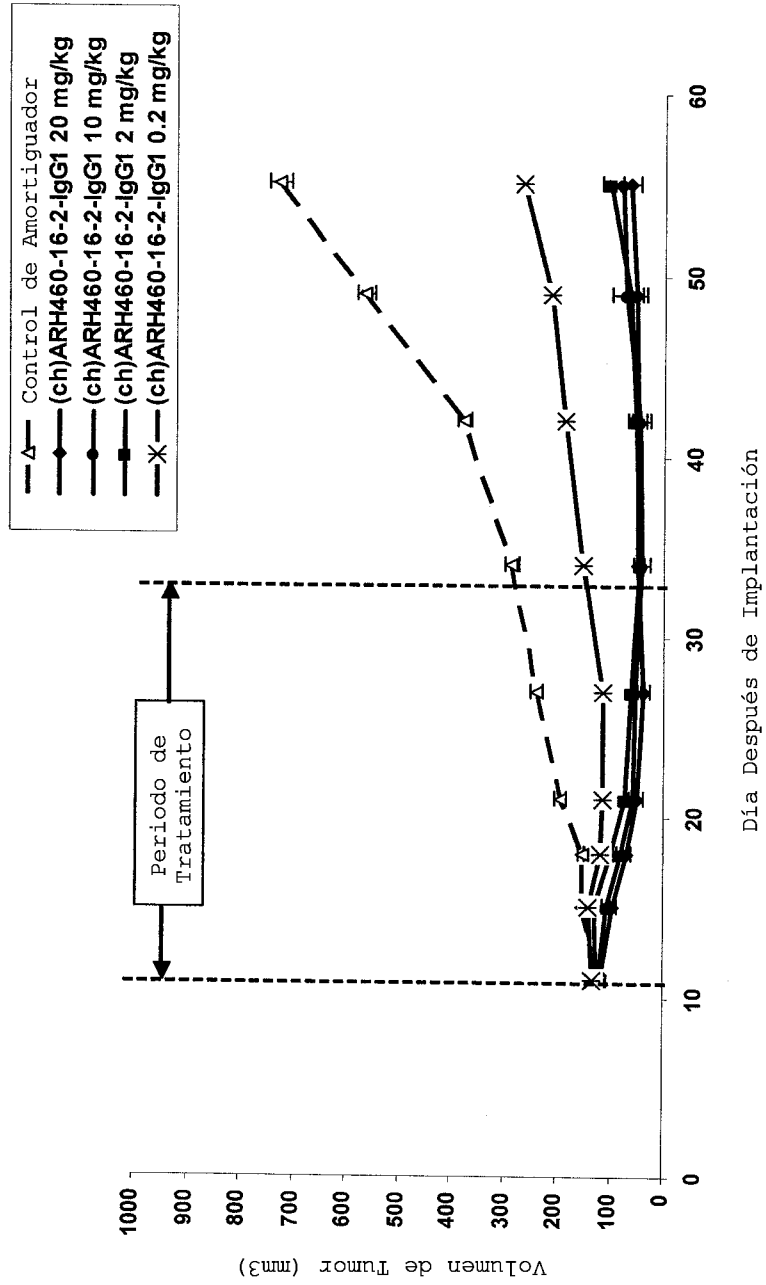


FIGURA 6

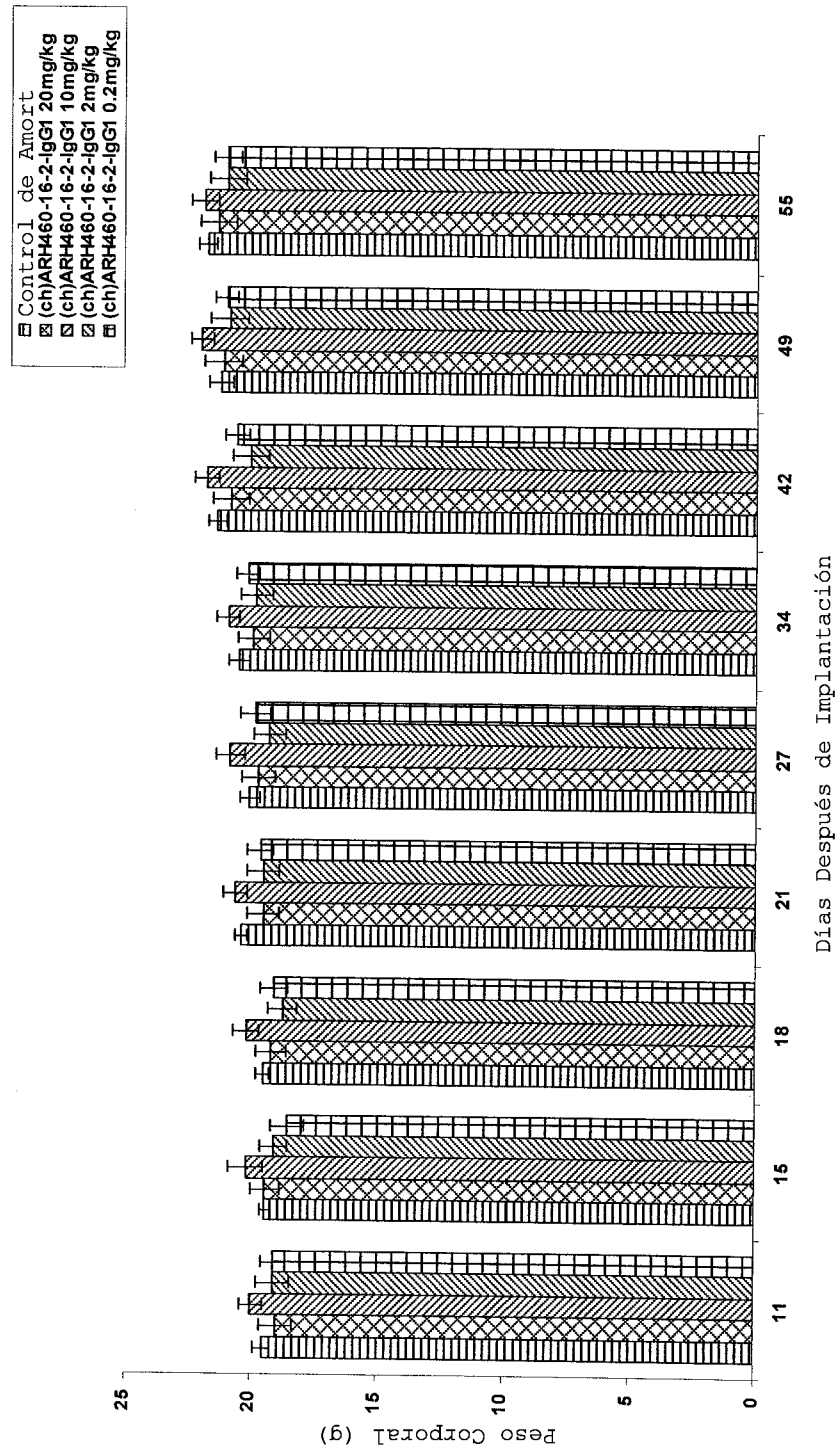


FIGURA 7

		Total	-	+/-	+	++	+++	Total Positivo
	Tejido Tumoral de Colon	59	23	8	17	9	2	36/59 (61%)
	I	0	0	0	0	0	0	0
	II	29	10	5	6	8	0	19/29 (66%)
	III	25	11	2	9	1	2	14/25 (56%)
	IV	5	2	1	2	0	0	3/5 (60%)
Etapas de Tumor (AJCC)								

FIGURA 8B

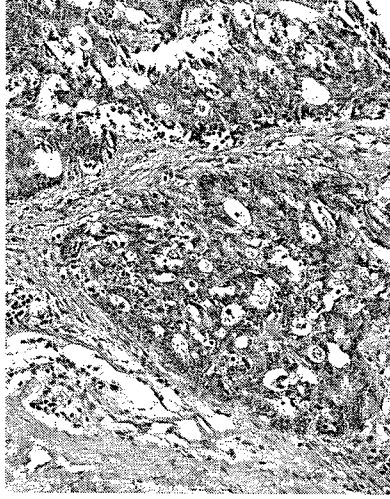


FIGURA 8A



FIGURA 9

Tejido	Anticuerpo Quimérico Humano	Control de Isotipo Humano	Anticuerpo Quimérico de Cynomolgus	Control de Isotipo de Cynomolgus
Sangre, Periférica	Pmn3, lym o mono 3	0	Pmn3, mono 0	ND
Médula Ósea	My3, mac3, Mega0, Ery0	My1, mac1	Pmn3, mac2 Mega0, Ery0	ND
Cerebro, Corteza	N0, WM2	0	N3, nuc, WM, glia nuc	N1, WM0-1
Colon	Epi 0, gan nuc	0	Epi 2, lym 2, gan nuc 3, NE2	NE 1
Ojo	Mac3	Mac2	Retina, RPE, lente, córnea 2-3	Retina, RPE, lente, córnea 2-3
Corazón	0, sonrojo raro nuc	0	Nuclear 50%	0
Riñón	Núcleo débil DCT	0	DCT, PCT, glom nuc	0
Hígado	0, raro PMN	0	Conducto biliar nuclear, pmn	0
Pulmón	Resp2, mac3, T2-3	0	Resp2 nuc, T1 y T2 nuc	0
Ovario	Oo 0, foll 0, theca 3	0	Oo 2, foll 2, nuclear; y cito, germin 2	0
Páncreas	0	0	Islote nuc 75% ductos nuc 50%	0
Músculo Esquelético	0	0	0	0
Piel	Epi 2-3 cyto y nuc, ecc memb, seb 2	0	Epi, pelo, seb, ecc 2 nuc	0
Bazo	Pmn3, mac3	0	Mac, lym pmn nuc, endo neg	0
Testículo	nuc raro, cito espermatocito 2	0	Spermato 75% cito y nuc	0
Tiroide	0	0	0	0

- Leyenda: células polinucleares; Lym: lifocitos; Mono: monocitos; ND: no determinado; My: mielocitos; Mac: macrófagos; Meg: megacariocitos; Ery: eritrocitos; N: neurona; nuc: núcleo; WM: materia blanca; Epi: Epitelial; Gan nuc: núcleo de ganglio; núcleo de células ganglios; PRE: epitelio pigmentado retinal; DCT: túbulos complejos distantes; PDT: núcleo complejo próximo; Glom nuc: núcleo de células glomerulares; Resp: respiratorio; Oo: oocitos; Cito: citoplasma; Ecc: glándulas sudoríparas ecrinas; Seb: glándulas sebáceas; Endo: endotelio; Spermato: espermatoцитos

10/25

FIGURA 10A

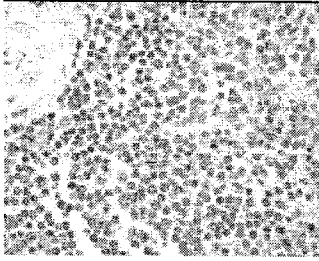
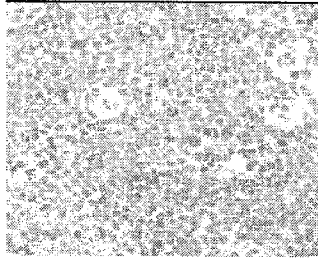
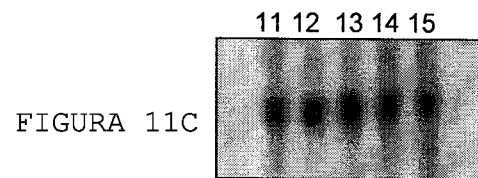
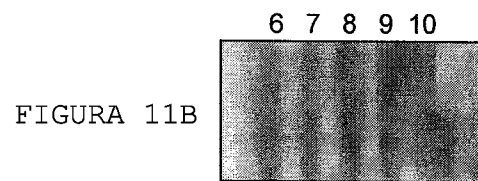
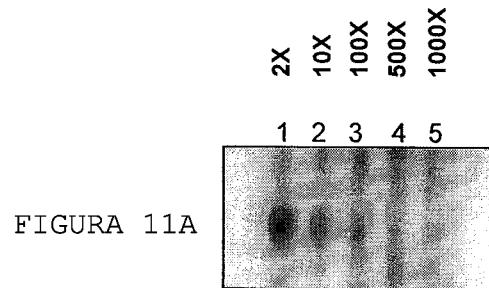


FIGURA 10B





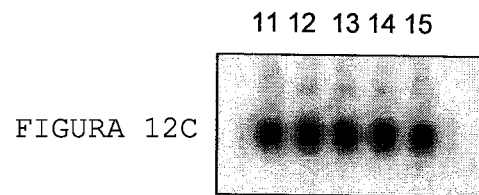
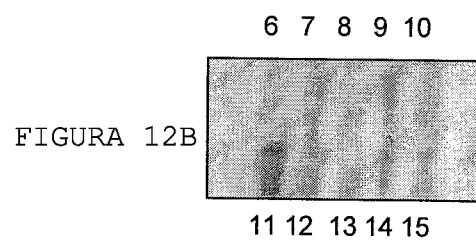
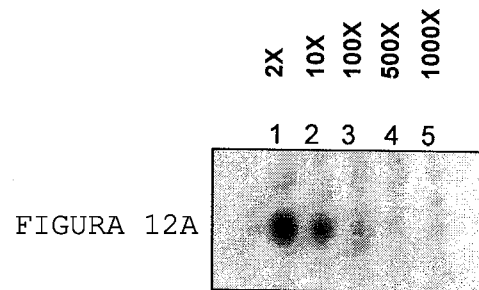


FIGURA 13

Anticuerpo	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
AR37A335.8	9.425E-11	1.655E+6	1.560E-4

FIGURA 14

Proteína Fosforilada (Objetivo)	Por ciento de Supresión Con (ch) ARH460-16-2-IgG1
Tie-1	51

FIGURA 15

Código de Antitopo	Secuencia	Longitud	Nombre-Mezcla
OL024	ATGRAGWCACAKWCYCAGGTCTTT	24	MuI γ kV _L 5'-LA
OL025	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT	25	MuI γ kV _L 5'-LB
OL026	ATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT	29	MuI γ kV _L 5'-LC
OL027	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGIWTCTT	32	MuI γ kV _L 5'-LD
OL028	ATGGGCWTCAAGATGRAGTCACAKWYCWGG	31	MuI γ kV _L 5'-LD
OL029	ATGAGTGTGCYCACTCAGGTCCTGGS GTT	29	MuI γ kV _L 5'-LE
OL030	ATGTGGGGAYCGKTTTYAMMCTTTTCAATTG	31	MuI γ kV _L 5'-LE
OL031	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC	28	MuI γ kV _L 5'-LE
OL032	ATGAGIMMKTCTIMTTCAITTCYTGGG	26	MuI γ kV _L 5'-LF
OL033	ATGAKGTHCYCIGCTCAGYTYCTIRG	26	MuI γ kV _L 5'-LF
OL034	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG	25	MuI γ kV _L 5'-LF
OL035	ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTCT	27	MuI γ kV _L 5'-LF
OL036	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT	29	MuI γ kV _L 5'-LG
OL037	ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT	29	MuI γ kV _L 5'-LG
OL038	ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG	27	MuI γ kV _L 5'-LG
OL039	ATGGTYCTYATVTTRCTGCTGCTATGG	27	MuI γ kV _L 5'-LG
OL040	ACTGGATGGTGGGAAGATGGA	21	MuI γ kV _L 3'-1
OL041	ATGGCCTGGAYTYCWCTYWTMYTCT	25	MuI γ λV _L 5'-LI
OL042	AGCTCYTCWGWGAIGGYGGRAA	23	MuI γ λV _L 3'-1

FIGURA 16

Código de Antitopo	Secuencia	Longitud	Nombre-Mezcla
OL007	ATGRASTTSKGGYTMARCTKGRTTT	25	MuIgV _H 5'-HA
OL008	ATGRAATGSASCTGGGTYWTYCTCTT	26	MuIgV _H 5'-HB
OL009	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCCT	29	MuIgV _H 5'-HC
OL010	ATGGCTGTCYTRGBGCTGYTCYTCTG	26	MuIgV _H 5'-HC
OL011	ATGGVTTGGSTGTGGAMCTTGCYATTCCT	29	MuIgV _H 5'-HC
OL012	ATGAAATGCAGCTGGRTYATSTTCTT	26	MuIgV _H 5'-HD
OL013	ATGGRCAGRCTTACWYYTCATTCCT	26	MuIgV _H 5'-H-D
OL014	ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT	26	MuIgV _H 5'-HD
OL015	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	26	MuIgV _H 5'-HE
OL016	ATGAAGWTGTGGBTRAACTGGRT	23	MuIgV _H 5'-HE
OL017	ATGGRATGGASCKKIRTCTTTMTCT	25	MuIgV _H 5'-HE
OL018	ATGAACCTTYGGGYTSAGMTTGRTTT	25	MuIgV _H 5'-HF
OL019	ATGTACTTGGGACTGAGCTGTGTAT	25	MuIgV _H 5'-HF
OL020	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG	23	MuIgV _H 5'-HF
OL021	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG	28	MuIgV _H 5'-HF
OL023	CCAGGGGCCARKGGATARACIGRTGG	26	MuIgGV _H 3'-2

FIGURA 17

-----CDR1-----
E V K L L E S G G G L V Q P G G S L K L S C A T S G F D F S R Y W M
10 20 30

-----CDR2-----
-
S W V R Q A P G K G L E W I G E V N P D S T S I N Y T P S L K D Q F
40 50 52 A 60

-----CD-----
I I S R D N A K N T L D L Q M S K V S S E D T A L Y Y C T R P N Y Y
70 80 82 A B C 90

R3-----
G S R Y H Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S
100 A B C D E F G 110

FIGURA 18

-----CDR1-----
D I Q M T Q T T S S L S V S L G D R V T I N C R A S Q D I N N Y L N
10 20 30

-----CDR2-----
W Y Q Q K P D G T V K L L I Y Y T S R L H S G V P S R F S G S G S G
40 50 60

-----CDR3-----
T D F S L T I S N L E K E D V A T Y F C Q Q G S T L P F T F G S G T
70 80 90 100

K L E I K
106 A

FIGURA 19

Código de Antitopo	Secuencia	Longitud
OL 437	GTTGCTACGCGTGTCCACTCCGAGGTGAAGCTGCTCGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCTCCCTG	75
OL 438	CCCAGAAAGCTTACCTGAGGAAACGGTGACTGAGG	35
OL 440	GTTGCTACGCGTGTCCACTCCGAGGTGCAGCTTGTGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGC	58
OL 441	CTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCAGG	58
OL 442	GGGAAAGGGCTAGTGTGGGTTGGAGAAGT	29
OL 443	CCACACTAGCCCTTTCCCTGGAGCC	25
OL 444	TACGCTGTACCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAAGACACAGCCGTGTATTACTG	57
OL 445	ATTTGCAGGTACAGCGTATTTTGGCGTTGTCTCTGGAGATGGTGAATCTATCCTT	56
OL 446	CCCAGAAAGCTTACCTGAGGAAACGGTGACCAGGTTCCCTG	42
OL 447	CTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCTCCCTGAGACTCTCC	44
OL 448	GGGAAAGGGCTAGTGTGGATTGGAGAAGT	29
OL 449	ATTTGCAGGTACAGCGTATTTTGGCGTTGTCTCTGGAGATGGTGAATTG	50

FIGURA 20

Código de Antitopo	Secuencia	Longitud
OL 439	TCCCAGGCGCGGATGTGATATCCAGATGACACAGAC	37
OL 090	CTGCCAGGATCCAACCTGAGGAAGCAAAAGTTTAAATTCTACTCACGTTTTATTTCCAAACCTTTGTCCCCG	68
OL 450	TCCCAGGCGCGGATGTGATATCCAGATGACACAGTCTcCATCCTCCCTGTCTG	54
OL 451	CTcCATCCTCCCTGTCTGTGcCTCTgTGGGAGACAGAGTCACCATCAcTTGCAG	52
OL 452	CAGAAACCAGgTaaAgCTccTAAACTCCTG	30
OL 453	CAGGAGTTTAggAGcTtAcCTGGTTTCTG	30
OL 454	CAGCCTGcAGcctGAAGATaTTGCCACTTACTaTTGCCAAC	41
OL 455	TCTTCaggCTgCAGGcTGCTAATGGTGaaAGtAAAAATCTGTTC	43
OL 456	GTTTAAATTTCTACTCACGTTTTATTTCCAAACCTTTGTCCCCctgGCCGAACG	50
OL 367	TAAGCTCCTGATCTATAATGC	21

FIGURA 21

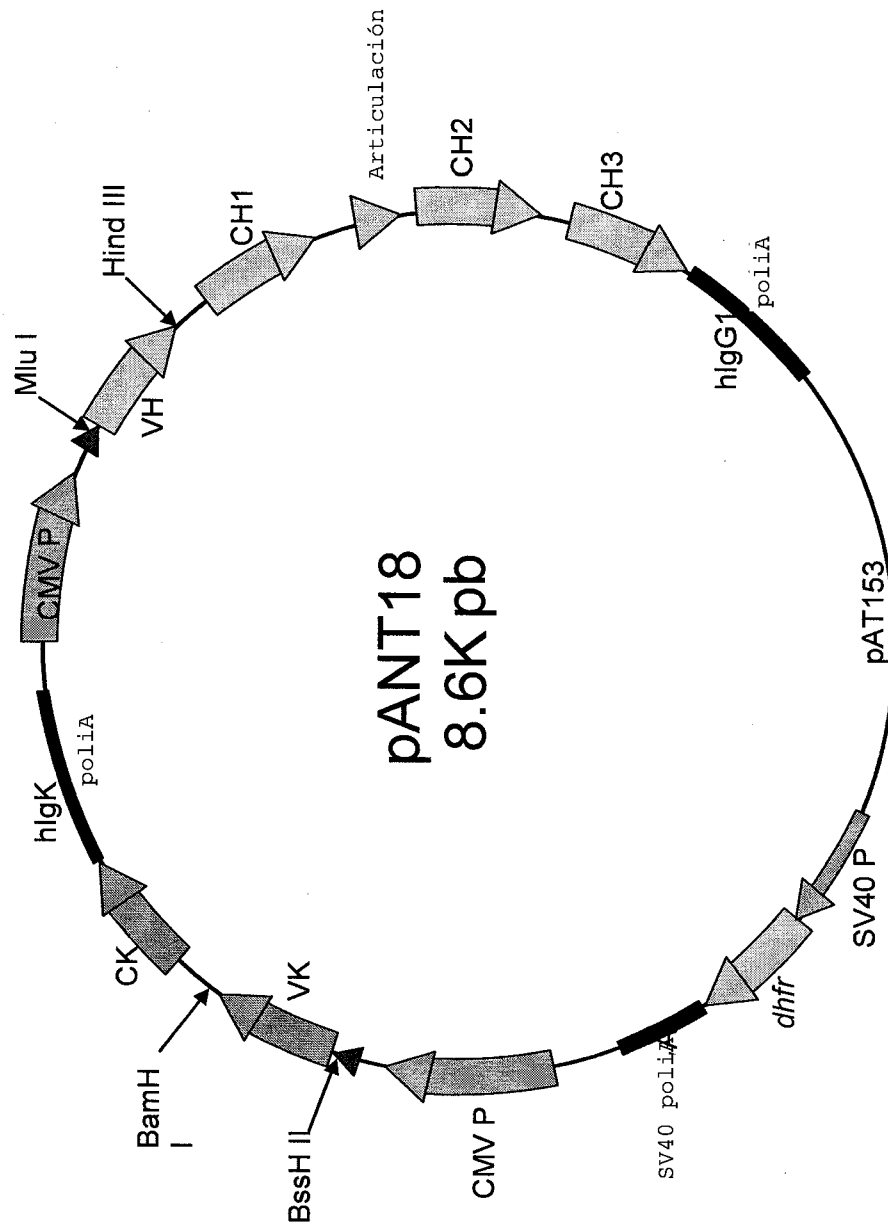


FIGURA 22

HV1 de Cadena Pesada

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F D F S R Y W M
10 20 30
-----CDR1-----
S W V R Q A P G K G L V W V G E V N P D S T S I N Y T P S L K D R F
40 50 60
-----CDR2-----
T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R P N Y Y
70 80 90
-----CD-----
R3-----
G S R Y H Y Y A M D Y W G Q G T L V T V S S
100 A B C D E F G 110

HV2 de Cadena Pesada

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A T S G F D F S R Y W M
10 20 30
-----CDR1-----
S W V R Q A P G K G L V W I G E V N P D S T S I N Y T P S L K D Q F
40 50 60
-----CDR2-----
T I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C T R P N Y Y
70 80 90
-----CD-----
R3-----
G S R Y H Y Y A M D Y W G Q G T L V T V S S
100 A B C D E F G 110

FIGURA 23

KV1 de Cadena Ligera

D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	I	N	N	Y								
						10								20																									
																												-----CDR1-----											

L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y T S R L H S
-----CDR2-----
 40 50 60
G V P S R F S G S

S G T D F F T I S S L Q P E D I A T Y C
70 80

Q Q G S T L P F T

90

-----CDR3-----
F

G Q G T K L E I K
100 106 A

FIGURA 24

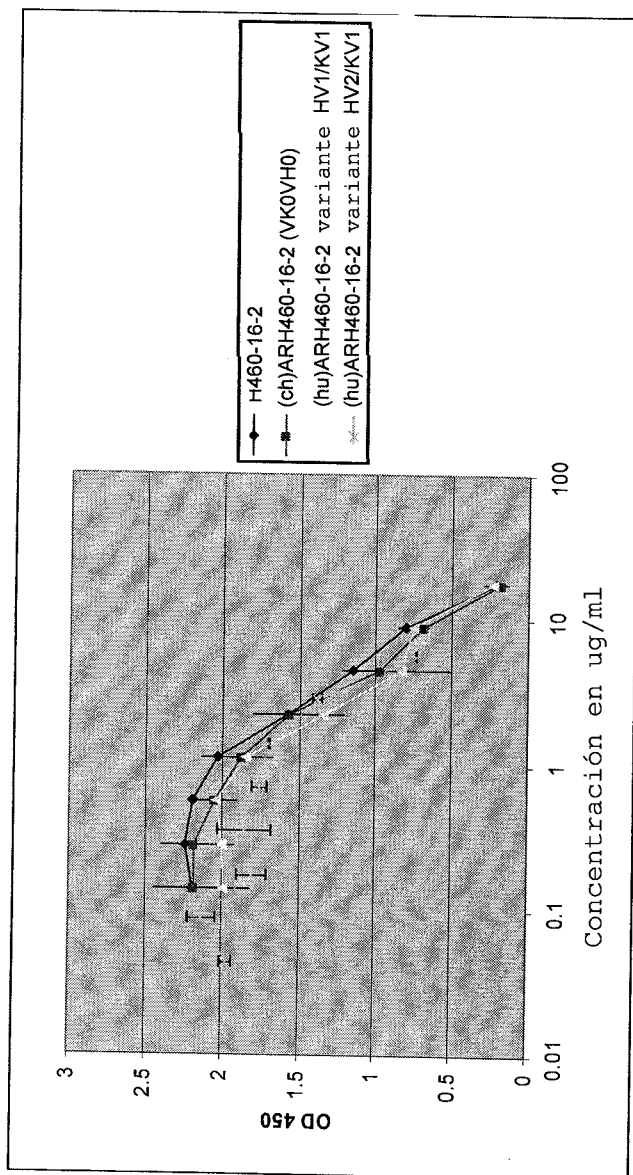


FIGURA 25

Anticuerpo	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
H460-16-2 *	4.19E-09	6.35E+04	2.67E-04
(hu)ARH460-16-2 HV1/KV1	6.32E-09	3.54E+04	2.25E-04
(hu)ARH460-16-2 HV2/KV1	3.17E-09	8.01E+04	2.54E-04

* Promedio de 3 experimentos independientes

ATCC

10801 University Blvd · Manassas, VA 20110-2209 ·Teléfono: 703-365-2700 ·Fax: 703-365-2745

TRATADO DE BUDAPEST PARA EL RECONOCIMIENTO INTERNACIONAL DEL DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA LOS PROPÓSITOS DE PROCEDIMIENTO DE PANTENTE
FORMA INTERNACIONAL

RECEPCIÓN EN EL CASO DE UN DEPÓSITO ORIGINAL EMITIDO DE ACUERDO A LA REGLA 7.3 Y DECLARACIÓN DE VIABILIDAD EMITIDA DE ACUERDO A LA REGLA 10.2

Para: (Nombre y Dirección de Depositante o Abogado)
Arius Research Inc.
Attn: Jaen de Sousa-Hitzler
55 York Street 16th Floor
Toronto, Ontario
Canada M5J 1R7

Depositado a nombre de: Arius Research Inc.	Designación de Depósito de
Referencia de Identificación por Depositante:	Patente
Híbridoma de Ratón: H460-16-2	PTA-4621
Híbridoma de Ratón: H460-22-1	PTA-4622
Híbridoma de Ratón: 7BDI-60	PTA-4623

El depósito se acompañó por: ____una descripción científica ____ una descripción taxonómica sugerida indicada posteriormente,

El depósito se recibió el: 04 de Septiembre de 2002 por esta Autoridad Depositaria Internacional y se ha aceptado.

A SU PETICIÓN: X Se le informará de peticiones para la cepa durante 30 años.

La cepa se hará disponible si una oficina de patentes firmante del Tratado de Budapest certifica a alguien el derecho de recibir o si se emite una Patente de los Estados Unidos citando la cepa, y la ATCC se instruye por la Oficina Norteamericana de Patentes y Marcas o el depositante para liberar la cepa.

Si el cultivo muere o se destruye durante el término efectivo del depósito, será responsabilidad reemplazarlo con cultivo vivo del mismo.

La cepa se mantendrá durante un periodo de al menos 30 años desde la fecha de depósito, o cinco años después de la petición más reciente para una muestra, cualquiera que sea más prolongado. Los Estados Unidos y muchos otros países son firmantes al Tratado de Budapest.

La viabilidad del cultivo citado anteriormente se probó el 06 de Septiembre de 2002. En esa fecha, el cultivo era viable.

Autoridad Depositaria Internacional: Colección Americana de Cultivo de Especies, Manassas, VA 20110-2209 EUA.

Firma de persona que tiene autoridad para representar la ATCC:

(Rúbrica) _____	Fecha:09 de
Octubre de 2002	
Marie Harris, Especialista de Patentes Depositario de Patentes ATTC	

cc: Mr. Ferris Lander
(Ref.: Tiquete o Caso No. 2056.009 & US No. de Serie 09/727361)

ATCC

10801 University Blvd • Manassas, VA 20110-2209 • Telephone: 703-365-2700 • FAX: 703-365-2745

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF
THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE****INTERNATIONAL FORM****RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT ISSUED PURSUANT TO RULE 7.3
AND VIABILITY STATEMENT ISSUED PURSUANT TO RULE 10.****To: (Name and Address of Depositor or Attorney)**

Arius Research Inc.
Attn: Jean de Sousa-Hitzler
55 York Street 16th Floor
Toronto, Ontario
Canada M5J 1R7

Deposited on Behalf of: Arius Research Inc.**Identification Reference by Depositor:**

Mouse Hybridoma: H460-16-2
Mouse Hybridoma: H460-22-1
Mouse Hybridoma: 7BDI-60

Patent Deposit Designation

PTA-4621
PTA-4622
PTA-4623

The deposits were accompanied by: a scientific description, a proposed taxonomic description indicated above. The deposits were received September 4, 2002 by this International Depository Authority and have been accepted.

AT YOUR REQUEST: X We will inform you of requests for the strains for 30 years.

The strains will be made available if a patent office signatory to the Budapest Treaty certifies one's right to receive, or if a U.S. Patent is issued citing the strains, and ATCC is instructed by the United States Patent & Trademark Office or the depositor to release said strains.

If the cultures should die or be destroyed during the effective term of the deposit, it shall be your responsibility to replace them with living cultures of the same.

The strains will be maintained for a period of at least 30 years from date of deposit, or five years after the most recent request for a sample, whichever is longer. The United States and many other countries are signatory to the Budapest Treaty.

The viability of the cultures cited above was tested September 6, 2002. On that date, the cultures were viable.

International Depository Authority: American Type Culture Collection, Manassas, VA 20110-2209 USA.

Signature of person having authority to represent ATCC:

Marie Harris
Marie Harris, Patent Specialist, ATCC Patent Depository

Date: October 9, 2002

cc: Mr. Ferris Lander

(Ref: Docket or Case No.: 2056.009 & US Serial No. 09/727361)

TRADUCCION OFICIAL No.

de un documento escrito en Inglés, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

Traducción de la apostilla en inglés que se encuentra a continuación de la legalización de las firmas de los señores Klausner y Strebel, representantes legales de F. Hoffmann-La Roche, que aparecen en un documento de Poder, escrito en español e inglés, conferido a ALICIA LLORED A y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, expedida en idioma inglés por el notario Peter Kuster, bajo el No. 2004/20, el 17-08-2004, en Basilea, Suiza.

AUTENTICACION OFICIAL

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Suiza

Este documento público

2. Ha sido firmado por el Lic. iur. Peter Kuster

3. Actuando en calidad de notario público

4. Lleva el sello del mencionado notario

Certificado

5. en Basel (Basilea)

6. el 18 de agosto 2004

7. por la Cancillería de Estado del Cantón de Basel-Stadt

8. bajo el No 8835/13376

9. Sello

Cancillería de Estado

de la ciudad de Basel (Basilea)

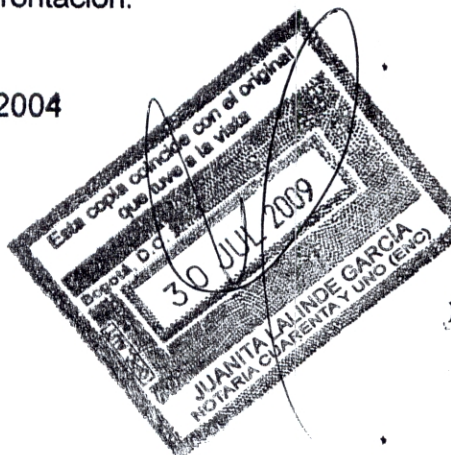
10. Firma

Fdo.: firma ilegible

Ruedi Eggs

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 2 de septiembre 2004



Maria Mercedes Uricoechea T.
 Traductora Juramentada
 Resolución 10607/81 Minjusticia

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

258651

2004 SET - 3 P 12: 12

Henry Uncochea

UCS

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.





Los abajo firmados, **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Suiza.

con domicilio en **4070 Basilea, Suiza**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado



The undersigned, **F.HOFFMANN-LA ROCHE AG**, a corporation organized and existing under the laws of Switzerland.

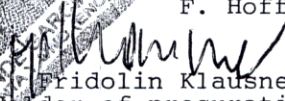
domiciled at **4070 Basel, Switzerland**

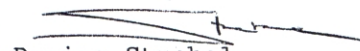
hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 17th day of August 2009.
F. Hoffmann-La Roche AG


Fridolin Klausner
Holder of procuration


Denise Strebel
Mandatory

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Suiza
Basilea

{ss

Hoy 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Stöbel a quien conozco y a quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es titular del poder/mandatario de F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Suiza, domiciliada en la ciudad de Basilea, Suiza, legalmente constituida para un periodo de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de Suiza; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Suiza, ciudad de Basilea, con fecha 19 Junio 1997, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Switzerland
Basel

{ss

On this 17th day of August, 2004, personally Fridolin Klausner and Denise Stöbel came both Swiss citizens and Swiss residents, to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the Holder of Procuration/Mandatory of F.HOFFMANN-LA ROCHE AG, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Switzerland, domiciled at the City of Basel, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of Switzerland; that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at Suiza, ciudad de Basel, under date of 19th day of June 1997, and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.

Basel, this 17-08-2004 (seventeenth day of two thousand and four)

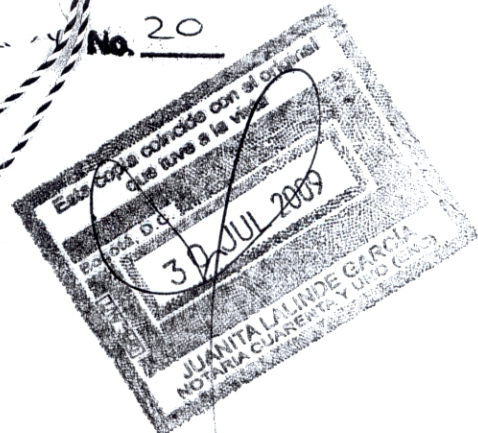
Dr. P. Kuster
Notar



Allg. Prot.

No. 20

Dr. Peter Kuster
Advokat und Notar
Peterskirchplatz 12
Postfach
CH-4001 Basel



OFFICIAL AUTHENTICATION

(Hague Convention of October 5th, 1961)

1. Country: Switzerland (Schweiz/Suisse)

This official document

2. is signed by Dr. J. P. Kuster

3. in his/her function as Att. Möser

4. and certified by the seal of the Gen. Sec.

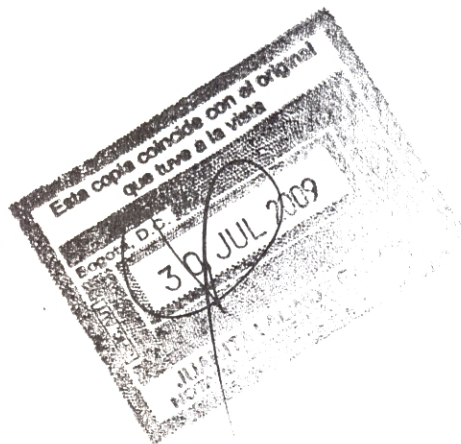
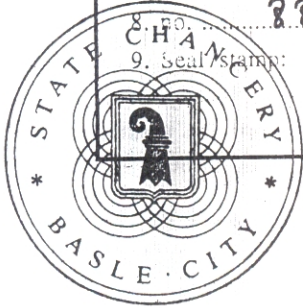
Certified 18. Aug. 2004

5. in Basel (Bâle) 6. on

7. by the State Chancery of the Canton of Basel-Stadt

8. No. 8835 / 10 776

9. Seal/stamp: 10. Signature: [Signature]



		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMATICO	
PATENTE DE INVENCION		PCT	<u>X</u>
MODELO DE UTILIDAD		DISEÑO INDUSTRIAL	
(21) N° de solicitud: 09-135.216A		(22) Fecha de solicitud: 26/11/09	
(51) Clasificación Internacional : C07K 16/30			
(71) Solicitante(s) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG			
(72) Inventor(es) YOUNG, David, S. F.; FINDLAY, Helen, P.; HAHN, Susan, E.; CECETTO, Lisa, M. y McCONKEY, Fortunata.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 11/807,887	(32) Fecha 30/05/07	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 30-12-09		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 23/05/08 No. De solicitud PCT/CA2008/000978		Fecha: 04/12/08 No. Publicación : WO 2008/144890 A1	
FIGURA CARACTERISTICA 6 x 6 cm			
(54) Titulo: "ANTICUERPOS ANTI-CD44 QUIMÉRICOS Y HUMANIZADOS QUE MEDIAN LA CITOTOXICIDAD DE CÉLULAS DE CÁNCER".			
(57) Resumen: Reivindicación número 1: Anticuerpo humanizado que se une específicamente al mismo epítipo o epítipos de CD44 humano como el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma H460-16-2 que tiene el acceso ATCC No. PTA-4621, caracterizado porque comprende: una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de amino ácidos de la región determinante de complementariedad de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3; y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de amino ácidos de la región determinante de complementariedad de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO:6; o un fragmento de unión a CD44 humano del mismo.			

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
PATENTE DE INVENCION		PCT	<u>X</u>
MODELO DE UTILIDAD		DISEÑO INDUSTRIAL	
(21) N° de solicitud: 09-135.216A		(22) Fecha de solicitud: 26/11/09	
(51) Clasificación Internacional : C07K 16/30			
(71)Solicitante(s) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG			
(72) Inventor(es) YOUNG, David, S. F.; FINDLAY, Helen, P.; HAHN, Susan, E.; CECETTO, Lisa, M. y McCONKEY, Fortunata.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 11/807,887	(32) Fecha 30-05-07	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 30-12-09		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 23/05/08 No. de solicitud PCT/CA2008/000978		Fecha: 04/12/08 N° publicación: WO 2008/144890 A1	
(54) Titulo: "ANTICUERPOS ANTI-CD44 QUIMÉRICOS Y HUMANIZADOS QUE MEDIAN LA CITOTOXICIDAD DE CÉLULAS DE CÁNCER".			

TRADUCCIÓN OFICIAL 2010-01-06-006
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS

Ontario
MINISTERIO DE SERVICIOS GUBERNAMENTALES

POR EL PRESENTE CERTIFICO LO SIGUIENTE:

JAMES DANIEL BLONDE

de la Provincia de Ontario, cuyo nombre está suscrito al Instrumento adjunto, era, en el momento de suscribir el presente, un **NOTARIO PUBLICO** en y para la Provincia de Ontario, Canadá, debidamente comisionado y debidamente autorizado por las leyes del mismo para tomar juramentos, tomar declaraciones y certificar la prueba de escrituras y otros instrumentos por escrito para ser registrados dentro de dicha Provincia;

ADEMAS CERTIFICO QUE he comparado la firma de dicho **NOTARIO PÚBLICO** suscrita en el Instrumento adjunto con la firma de muestra de dicho **NOTARIO PUBLICO** registrada en esta oficina y verdaderamente creo que dicha firma es auténtica; y QUE he comparado la impresión del Sello de dicho **NOTARIO PÚBLICO** que aparece sobre el Instrumento adjunto con la muestra del Sello registrado en esta oficina y verdaderamente creo que la impresión del Sello es auténtica.

Sello

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he colocado mi Firma y el Sello del Ministerio de Servicios Gubernamentales de la Provincia de Ontario en la Ciudad de Toronto en dicha

CERTIFICADO NOTARIAL

Yo, JAMES DANIEL BLONDE, un Notario Público en y para la Provincia de Ontario, por Autoridad Real debidamente nombrado, residente en la Ciudad de Burlington, en dicha Provincia,

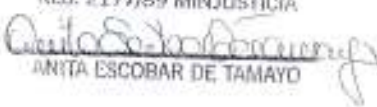
CERTIFICO Y AFIRMO que Lisa M. Chechetto, Helen P. Findlay, Susan E. Hahn, Fortunata McConkey y David S.F. Young, quienes sé que son los titulares de la solicitud de patente presentada en los Estados Unidos el 30 de mayo de 2007 bajo el No. 11/807887, ceden y transfieren a F. Hoffmann-La Roche AG todos los derechos y acciones que resulten de la solicitud anteriormente mencionada, ejecutaron el Traspaso anterior ante mí el día 2 de noviembre de 2009, y que ellos están legalmente facultados para ejecutar y dar dicho Traspaso.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he suscrito mi nombre y colocado mi Sello Notarial en Suite 1600, 1 First Canadian Place, 100 King Street West, Toronto, Notario, Canadá, este día 11 de noviembre de 2009.

(firma: ilegible)

Un Notario Público en y para la Provincia de Notario

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 6 de enero de 2010, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



MINISTRY OF GOVERNMENT SERVICES

I HEREBY CERTIFY AS FOLLOWS:

JAMES DANIEL BLONDE

of the Province of Ontario, whose name is subscribed to the attached Instrument, was, at the time of subscribing thereto, a **NOTARY PUBLIC** in and for the Province of Ontario, Canada, duly commissioned and duly authorized by the laws thereof to administer oaths, to take affidavits and to certify the proof of deeds and other instruments in writing to be recorded within the said Province.

I FURTHER CERTIFY THAT I have compared the signature of the said **NOTARY PUBLIC** subscribed to the attached Instrument with the specimen signature of the said **NOTARY PUBLIC** filed in this office and verily believe the said signature to be genuine; and THAT I have compared the impression of the Seal of the said **NOTARY PUBLIC** appearing on the attached Instrument with the specimen of the Seal filed in this office and verily believe the impression of the Seal to be genuine.



IN TESTIMONY WHEREOF I have hereunto set my Hand and affixed the Seal of the Ministry of Government Services of the Province of Ontario at the City of Toronto in the said Province this eighteenth day of November, A.D. 2009.

Shirley Tracy

for the MINISTER OF GOVERNMENT SERVICES

NOTARIAL CERTIFICATE

I, JAMES DANIEL BLONDE, a Notary Public, in and for the Province of Ontario, by Royal Authority duly appointed, residing at the City of Burlington, in the said Province,

DO CERTIFY AND ATTEST that Lisa M. Cechetto, Helen P. Findlay, Susan E. Hahn, Fortunata McConkey and David S. F. Young, known to me to be title holders of the patent application filed in the USA on May 30, 2007 under No. 11/807887, assigns and transfers to F. Hoffmann-La Roche AG all rights and actions resulting from the above-mentioned application, executed the foregoing Assignment before me the 2nd day of November, 2009, and that they are by law empowered to execute and give such an Assignment.

IN TESTIMONY WHEREOF I have hereto subscribed my name and affixed my Notarial Seal of Office at **Suite 1600, 1 First Canadian Place, 100 King Street West, Toronto, Ontario, Canada** this 2nd day of November, 2009.

11th JS



A Notary Public in and for the Province of Ontario

JAMES BLONDE

ASSIGNMENTCESION

it hereby known that

Conste por el presente que

Lisa M. Cechetto, scientist, a Canadian citizen
nit 510, DaeLim Arvill Apt House, Daesagwan 9 (gu)-gil 11,
ongsan-gu, Seoul 140-212, South Korea

Helen P. Findlay, scientist, a Canadian citizen
205 Glendornwynne Road
Toronto, Ontario M6P 3E9, Canada

Susan E. Hahn, scientist, a Canadian citizen
9 Innisfree Court
Toronto, Ontario M6S 3N7, Canada

Fortunata McConkey, scientist, a Canadian citizen
RR#4
Shelburne, Ontario L0N 1S8, Canada

David S. F. Young, scientist, a Canadian citizen
33 University Avenue, Suite 2407
Toronto, Ontario M5J 2S7, Canada

title holder(s) of the patent application(s) filed in

titular(es) de la(s) solicitud(es) de patente
presentada(s) en

<u>Country</u>	<u>Filing date</u>	<u>Serial No.</u>
USA	30.05.2007	11/807887

assign(s) and transfer(s) to

ceden y transfieren a favor de

F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
CH-4070 Basle (Switzerland)

all rights and actions resulting from the above-
mentioned application(s) as far as Colombia is
concerned, including the right to claim the priority of
the previous application(s).

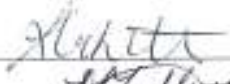
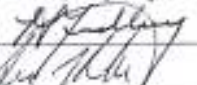
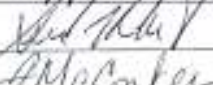
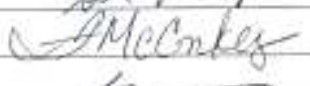
todos los derechos y acciones emergentes de la(s)
referida(s) solicitud(es) en lo que se refiere a
Colombia, incluso el derecho de prevalerse de la
prioridad del depósito anterior.

Signed at Toronto, CANADA

Firmado en

Date: November 2, 2009

con fecha

	Lisa M. Cechetto
	Helen P. Findlay
	Susan E. Hahn
	Fortunata McConkey
	David S. F. Young



Apostille required