



CSA084336



Organización y
Digitalización CSA Ltda.

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

09-135218

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO "ANTICUERPOS ANTI -TROP-2 HUMANIZADOS
Y QUIMÉRICOS QUE MEDIAN CITOTOXICIDAD DE
CELULAS CANCEROSAS"

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL C07K 16/30

71. SOLICITANTE F.HOFFMANN- LA ROCHE AG

DOMICILIO BASILEA, SUIZA

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

72. BOGOTA, D.C.

26 NOV 2009

(FORMA P 10)

71b 202099.

Fr 30-12-2009

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-135218- -00000-0000

Fecha: 2009-11-26 17:21:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 253

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG

Dirección: Grenzacherstrasse 124 CH-4070
Basilea, Suiza.

Nacionalidad o Domicilio: Basilea, Suiza

Lugar de Constitución: Suiza

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: YOUNG, David, S., F.; FINDLAY, Helen P.; HAHN, Susan, E.; DA
CRUZ, Luis, A., G. y FERRY, Alison, L.

Dirección: 33 University Avenue, Suite 2407, Toronto, Ontario M5J 2S7; 205
Glendonwynne Road, Toronto, Ontario M6P 3E9; 9 Innisfree Court, Toronto,
Ontario M6S 3N7; 57 Nipigon Avenue Toronto, Ontario M2M 2V9 y 143
Grenadier Crescent, Thomhill, Ontario L4J 7V6.

Nacionalidad o Domicilio: Canada

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/ CA2008/000979

Fecha: 23-05-08

Publicación Internacional No. WO 2008/144891 A1

Fecha: 04-12-08

⑥

Título (54)

“ANTICUERPOS ANTI-TROP-2 HUMANIZADOS Y QUIMÉRICOS QUE MEDIAN
CITOTOXICIDAD DE CELULAS CANCEROSAS”

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 16/30

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

30-05-07

(31) Número de Solicitud

11/807,837

⑨

Comprobante de Pago No. 09 -77,262

Fecha: 13-10-09

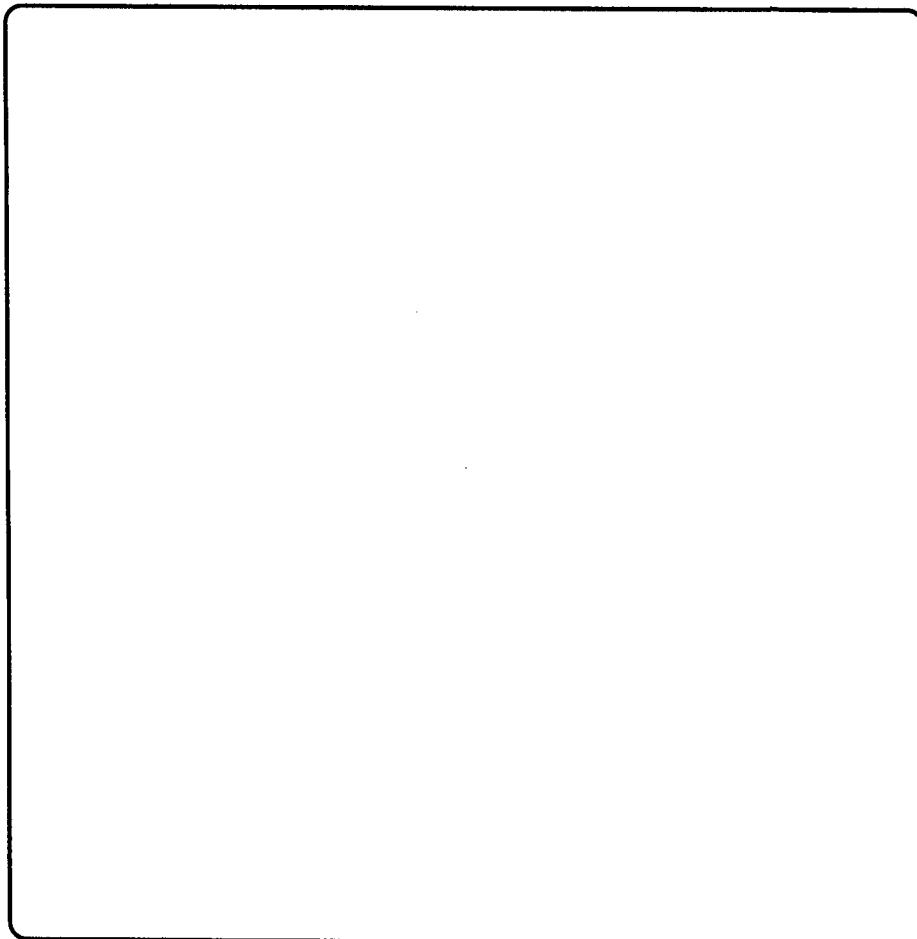
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documentos que acreditan la existencia y representación legal cuando los solicitantes sean personas jurídicas.
- ☒ Documentos de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Declaraciones (Declaración bajo las Reglas 4.17(ii) y 51bis 1(a)(ii) que acreditan el traspaso de los inventores al solicitante)
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de búsqueda Internacional, publicación, notificación de cambio de nombre del solicitante, notificación de cambio de dirección del inventor Da cruz, Luis, A., G., documento de indicaciones relacionadas con microorganismos depositados u otro material biológico con su traducción, opinión escrita y Listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicitud la concesión de la patente.

NOMBRE: AUCIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.590.713

T.P. 53.216

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 77,262
FECHA : OCTUBRE 13 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-135218- -00000-0000

Fecha: 2009-11-26 17:21:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 253

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLDREDA Y CIA S. A	RECIBO DE CAJA			76955	13/10/2009	8,133,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

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

10. Firma

Cancillería de Estado

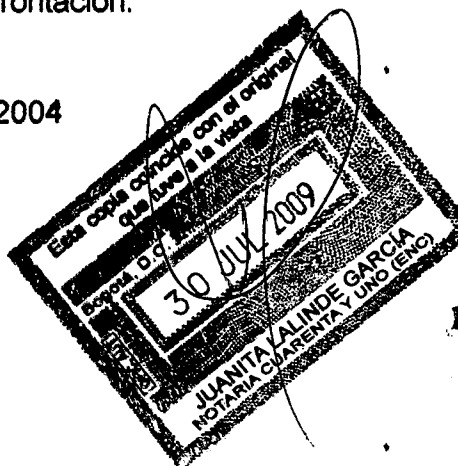
Fdo.: firma ilegible

de la ciudad de Basel (Basilea)

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

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

258651

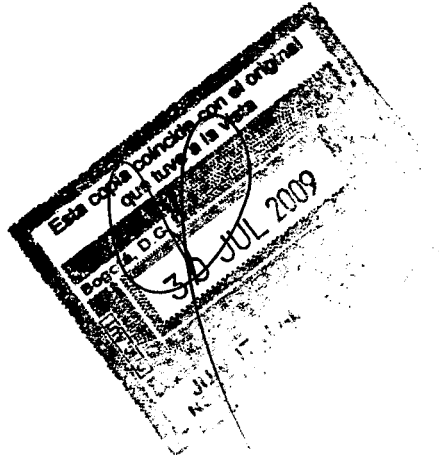
Mano Uncochea

COYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

2004 SET - 3 P 12:12

UCS

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**

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

domiciled at **4070 Basel, Switzerland**

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.

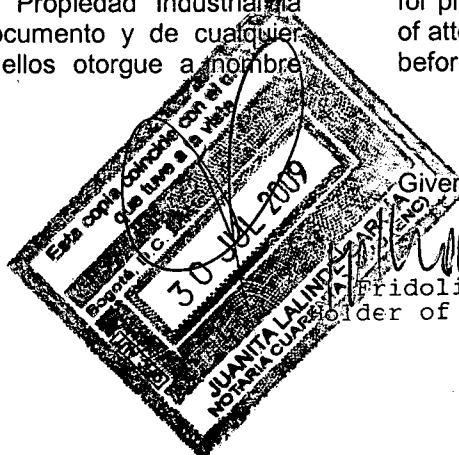
Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

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
Fridolin Klausner
Attorney at law

Denise Strebel
Denise Strebel
Mandatory

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Suiza
Basilea

{ss

Hoy 17 de Agosto de 2004, compareció Fridolin Klausner y Denise Strehel a quien conozco y de 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 período 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).

Switzerland
Basel

{ss

On this 17th day of August, 2004, personally, Fridolin Klausner and Denise Strehel 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 August, two thousand and four)

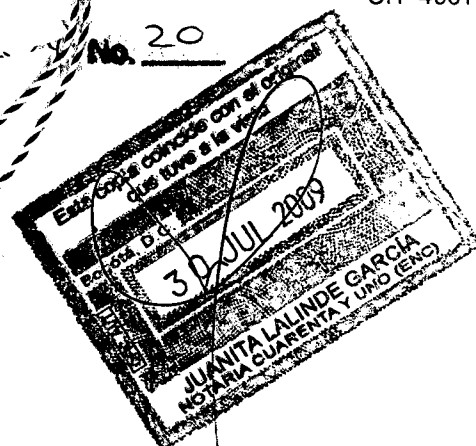
H. P. Kuster
Notar



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/Guisse)

This official document

2. is signed by *P. Kuster*

3. in his/her function as *Att. Moller*

4. and certified by the seal of the *Gmüden*

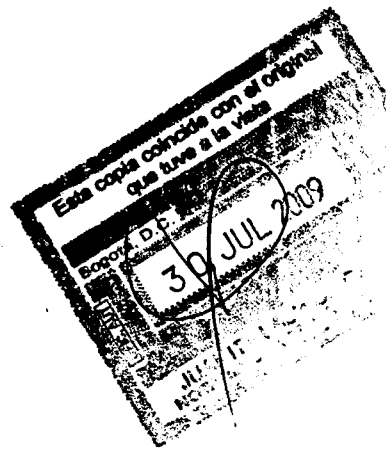
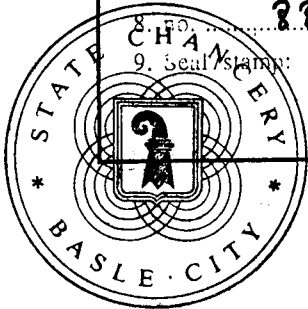
Certified **18. Aug. 2004**

5. in Basel (Bâle) 6. on

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

8. no. **8835 / 10 326**

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



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 16/30	
(22) Fecha de solicitud: 26-11-09		(71) Solicitante(s): F. HOFFMANN - LA ROCHE AG	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 11/807,837	(32) Fecha 30-05-07	(33) País US
		(72) Inventor(es): YOUNG, David, S., F.; FINDLAY, Helen P.; HAHN, Susan, E.; DA CRUZ, Luis, A., G. y FERRY, Alison, L.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 20-12-09		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 04-12-08	
Fecha de presentación de la solicitud: 23-05-08		No. publicación: WO 2008/144891 A1	
No. de solicitud: PCT/CA2008/000979			
(54) Título: "ANTICUERPOS ANTI-TROP-2 HUMANIZADOS Y QUIMÉRICOS QUE MEDIAN CITOTOXICIDAD DE CELULAS CANCEROSAS"			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Un método de reducción de un tumor pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano en un mamífero, caracterizado porque el tumor pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano expresa al menos un epítipo de un antígeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma depositada en la IDAC con el número de registro 141205-05 o un CDMAB del mismo, CDMAB con capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su antígeno objetivo, y que comprende administrar al mamífero el anticuerpo monoclonal o CDMAB del mismo en una cantidad efectiva para dar como resultado una reducción de la carga tumoral de páncreas, seno, próstata, ovario o colon del mamífero.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) No. de solicitud:

(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.; DA CRUZ, Luis, A., G. y FERRY, Alison, L.

(74) Apoderado: **ALICIA LLORED A RICAURTE**

(30) Prioridad

(31)

No. Prioridad

11/807,837

(32)

Fecha

30-05-07

(33)

País

US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 20-12-09

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 04-12-08

Fecha de presentación de la solicitud: 23-05-08

N° publicación: **WO 2008/144891 A1**

No. de solicitud: **PCT/CA2008/000979**

(54) Título: " **ANTICUERPOS ANTI-TROP-2 HUMANIZADOS Y QUIMÉRICOS QUE MEDIAN CITOTOXICIDAD DE CELULAS CANCEROSAS**



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) No. de solicitud: (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.; DA CRUZ, Luis, A., G. y FERRY, Alison, L.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	11/807,837	30-05-07	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 20-12-09

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 23-05-08
No. de solicitud: **PCT/CA2008/000979**

(87) Publicación internacional:

Fecha: 04-12-08
No. Publicación : **WO 2008/144891 A1**

FIGURA CARACTERISTICA
6x6cm

(54) Título: **"ANTICUERPOS ANTI-TROP-2 HUMANIZADOS Y QUIMÉRICOS QUE MEDIAN CITOTOXICIDAD DE CELULAS CANCEROSAS"**

(57) Resumen:

Reivindicación número 1.-

1. Un método de reducción de un tumor pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano en un mamífero, caracterizado porque el tumor pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano expresa al menos un epítipo de un antígeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma depositada en la IDAC con el número de registro 141205-05 o un CDMAB del mismo, CDMAB con capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su antígeno objetivo, y que comprende administrar al mamífero el anticuerpo monoclonal o CDMAB del mismo en una cantidad efectiva para dar como resultado una reducción de la carga tumoral de páncreas, seno, próstata, ovario o colon del mamífero.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
4 December 2008 (04.12.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/144891 A1

(51) International Patent Classification:

C07K 16/30 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/46 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) C12P 21/08 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/CA2008/000979

(22) International Filing Date: 23 May 2008 (23.05.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

11/807,837 30 May 2007 (30.05.2007) US

(71) Applicant: ARIUS RESEARCH INC. [CA/CA]; 55 York Street, 15th Floor, Toronto, Ontario M5J 1R7 (CA).

(72) Inventors: YOUNG, David, S., F.; 33 University Avenue, Suite 2407, Toronto, Ontario M5J 2S7 (CA). FINDLAY, Helen P.; 205 Glendonwyne Road, Toronto, Ontario M6P 3E9 (CA). HAHN, Susan, E.; 9 Innisfree Court, Toronto, Ontario M6S 3N7 (CA). DA CRUZ, Luis, A., G.; 9 Innisfree Court, Toronto, Ontario M6S 3N7 (CA). FERRY, Alison, L.; 143 Grenadier Crescent, Thornhill, Ontario L4J 7V6 (CA).

(74) Agent: SINGLEHURST, John, C.; Finlayson & Singlehurst, 70 Gloucester Street, Ottawa, ON K2P 0A2 (CA).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

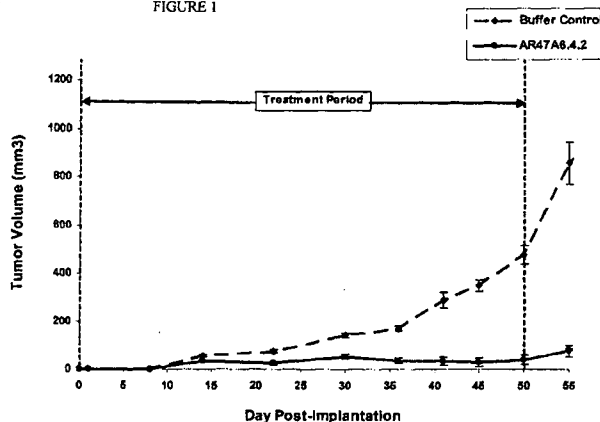
Declarations under Rule 4.17:

— as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))

[Continued on next page]

(54) Title: HUMANIZED AND CHIMERIC ANTI-TROP-2 ANTIBODIES THAT MEDIATE CANCER CELL CYTOTOXICITY

FIGURE 1



(57) Abstract: Expression of TROP-2, an approximately 35 kDa transmembrane protein and a substrate of protein kinase C, has been linked to several cancers. TROP-2 is also known as GA733-1, epithelial glycoprotein 1 (EGP-1) and tumor-associated calcium signal transducer-2. A monoclonal antibody against TROP-2 from the hybridoma AR47A6.4.2, deposited with the International Depository Authority of Canada (IDAC) as accession number 141205-05, was previously shown to be a cancerous disease modifying antibody (CDMAB), preventing tumour growth and reducing tumour burden in several cancer models including prostate, pancreatic and breast cancer by cytotoxicity. The variable regions of this monoclonal antibody were also isolated, sequenced and complementarity determining regions (CDRs) determined. Now, a chimeric antibody and humanized antibodies are generated that have similar TROP-2 binding activity as the parent 141205-05 monoclonal antibody. The monoclonal, chimeric and humanized antibodies can be conjugated to toxins, enzymes, radioactive compounds, cytokines, interferons, target or reporter moieties and hematogenous cells to treat cancer. These antibodies are also used in binding assays to determine TROP-2 expression on cells.

WO 2008/144891 A1

WO 2008/144891 A1



— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii))

— with sequence listing part of description published sepa-
rately in electronic form and available upon request from
the International Bureau

Published:

— with international search report

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SINGLEHURST, John, C.
Finlayson & Singlehurst
70 Gloucester Street
Ottawa, ON K2P 0A2
CANADA

Date of mailing (day/month/year) 11 August 2009 (11.08.2009)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 20561.092	
International application No. PCT/CA2008/000979	International filing date (day/month/year) 23 May 2008 (23.05.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address ARIUS RESEARCH INC. 55 York Street 15th Floor Toronto, Ontario M5J 1R7 Canada	State of Nationality CA	State of Residence CA
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address F. HOFFMANN-LA ROCHE AG Grenzacherstrasse 124 CH-4070 Basel Switzerland	State of Nationality CH	State of Residence CH
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The request for recording of the above change was received by the International Bureau between 20 and 30 months from the priority date.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Vernhes Thierry e-mail pt04.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 04
Facsimile No. +41 22 338 89 95	

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

Gowling Lafleur Henderson LLP.
160 Elgin Street, Suite 2600
Ottawa, Ontario
Canada K1P 1C3
CANADA

Date of mailing (day/month/year) 16 October 2009 (16.10.2009)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 08914545WO	
International application No. PCT/CA2008/000979	
International filing date (day/month/year) 23 May 2008 (23.05.2008)	

1. The following indications appeared on record concerning:

☐ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address DA CRUZ, Luis, A., G. 9 Innisfree Court Toronto, Ontario M6S 3N7 Canada	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address DA CRUZ, Luis, A., G. 57 Nipigon Avenue Toronto, Ontario M2M 2V9 Canada	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
The request for recording of the above change was received by the International Bureau between 20 and 30 months from the priority date.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Laniel David
Facsimile No. +41 22 338 89 95	e-mail pt04.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 04

**PATENT COOPERATION TREAT
PCT
INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 20561.092	FOR FURTHER ACTION		see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below
International application No. PCT/CA2008/000979	International filing date (<i>day/month/year</i>) 23 May 2008 (23-05-2008)	(Earliest) Priority date (<i>day/month/year</i>) 30 May 2007 (30-05-2007)	
Applicant ARIUS RESEARCH, INC.			

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed

☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the **title**,

☐ the text is approved as submitted by the applicant

☒ the text has been established by this Authority to read as follows :

Humanized And Chimeric Anti-TROP-2 Antibodies That Mediate Cancer Cell Cytotoxicity

5. With regard to the **abstract**,

☐ the text is approved as submitted by the applicant

☒ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1

☒ as suggested by the applicant

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2008/000979**Box No. I** Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☒ filed together with the international application in electronic form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments :

No statement as required in item 2 was furnished.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2008/000979**Box No. II** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :

1. ☒ Claim Nos. : 1 - 21, 23 - 28, 30 - 37 and 40 - 47

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Claims 1 - 21, 23 - 28, 30 - 37 and 40 - 47 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search. However, this Authority has carried out a search based on the alleged effects or purposes/uses of the product defined in claims 1 - 21, 23 - 28, 30 - 37 and 40 - 47.

2. ☐ Claim Nos. :

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :

3. ☐ Claim Nos. :

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos. :
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos. :

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

Expression of TROP-2, an approximately 35 kDa transmembrane protein and a substrate of protein kinase C, has been linked to several cancers. TROP-2 is also known as GA733-1, epithelial glycoprotein 1 (EGP-1) and tumor-associated calcium signal transducer-2. A monoclonal antibody against TROP-2 from the hybridoma AR47A6.4.2, deposited with the International Depository Authority of Canada (IDAC) as accession number 141205-05, was previously shown to be a cancerous disease modifying antibody (CDMAB), preventing tumour growth and reducing tumour burden in several cancer models including prostate, pancreatic and breast cancer by cytotoxicity. The variable regions of this monoclonal antibody were also isolated, sequenced and complementarity determining regions (CDRs) determined. Now, a chimeric antibody and humanized antibodies are generated that have similar TROP-2 binding activity as the parent 141205-05 monoclonal antibody. The monoclonal, chimeric and humanized antibodies can be conjugated to toxins, enzymes, radioactive compounds, cytokines, interferons, target or reporter moieties and hematogenous cells to treat cancer. These antibodies are also used in binding assays to determine TROP-2 expression on cells.

A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2008/000979

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: C07K 16/30 (2006.01), A61K 39/395 (2006.01), A61K 47/48 (2006.01), A61K 51/10 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01), A61P 37/04 (2006.01), C07K 16/28 (2006.01), C07K 16/46 (2006.01), C12P 21/08 (2006.01), G01N 33/574 (2006.01), G01N 33/577 (2006.01)		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC: C07K 16/30 (2006.01), A61K 39/395 (2006.01), A61K 47/48 (2006.01), A61K 51/10 (2006.01), A61P 35/00 (2006.01), A61P 37/04 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Databases: Canadian Patent Database, Delphion, USPTO, QWEB, CAPlus, Genome Quest, Pubmed and Scopus. Keywords: TROP-2, EGP-1, GA733-1, antibody, hybridoma, AR47A6.4.2, 141205-05, humanized, CDMAB, chimeric, inhibit*, cancer, Arius, Young		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/074566 A2 (IMMUNOMEDICS INC) 12 September 2003 Whole document	38, 39 and 48 - 60
X, P, &	US 2007/0202113 A1 (ARIUS RESEARCH INC.) 30 August 2007 Whole document - cited in the description as US Application No. 11/709,676 -	1 - 60
X, P, &	US 2007/0202043 A1 (ARIUS RESEARCH INC.) 30 August 2007 Whole document	1 - 60
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 22 July 2008 (22-07-2008)	Date of mailing of the international search report 14 August 2008 (14-08-2008)	
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476	Authorized officer Jacinth Abraham 819- 934-7598	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2008/000979

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :

1. ☒ Claim Nos. : 1 - 21, 23 - 28, 30 - 37 and 40 - 47
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Claims 1 - 21, 23 - 28, 30 - 37 and 40 - 47 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search. However, this Authority has carried out a search based on the alleged effects or purposes/uses of the product defined in claims 1 - 21, 23 - 28, 30 - 37 and 40 - 47.
2. ☐ Claim Nos. :
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :
3. ☐ Claim Nos. :
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos. :
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos. :

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2008/000979

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO 2003074566 A2	12-09-2003	AU 2003209447A1	16-09-2003
		CA 2478047A1	12-09-2003
		CN 1649903A	03-08-2005
		CN 100360567C	09-01-2008
		EP 1483295A2	08-12-2004
		IL 163852D0	18-12-2005
		JP 2006502698T	26-01-2006
		US 7238785B2	03-07-2007
		US 2004001825A1	01-01-2004
		US 2007212350A1	13-09-2007
		US 2008131363A1	05-06-2008
		WO 03074566A3	04-03-2004
US 2007202113A1	30-08-2007	US 2007202043A1	30-08-2007
		US 2008131428A1	05-06-2008
		WO 2007095748A1	30-08-2007
		WO 2007095749A1	30-08-2007
US 2007202043A1	30-08-2007	US 2007202113A1	30-08-2007
		US 2008131428A1	05-06-2008
		WO 2007095748A1	30-08-2007
		WO 2007095749A1	30-08-2007

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: SINGLEHURST, JOHN C. c/o Finlayson & Singlehurst 70 Gloucester Street 4th Floor OTTAWA, Ontario Canada, K2P 0A2		PCT WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)																	
		Date of mailing (day/month/year)	14 August 2008 (14-08-2008)																
Applicant's or agent's file reference 20561.092		FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below																	
International application No. PCT/CA2008/000979	International filing date (day/month/year) 23 May 2008 (23-05-2008)	Priority date (day/month/year) 30 May 2007 (30-05-2007)																	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC IPC: <i>C07K 16/30</i> (2006.01), <i>A61K 39/395</i> (2006.01), <i>A61K 47/48</i> (2006.01), <i>A61K 51/10</i> (2006.01), <i>A61P 35/00</i> (2006.01), <i>A61P 37/04</i> (2006.01) (more IPCs on the last page)																			
Applicant ARIUS RESEARCH, INC.																			
1. This opinion contains indications relating to the following items : <table border="0"> <tr> <td>☒ Box No. I</td> <td>Basis of the opinion</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. II</td> <td>Priority</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. III</td> <td>Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. IV</td> <td>Lack of unity of invention</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. V</td> <td>Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement</td> </tr> <tr> <td>☐ Box No. VI</td> <td>Certain documents cited</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. VII</td> <td>Certain defects in the international application</td> </tr> <tr> <td>☒ Box No. VIII</td> <td>Certain observations on the international application</td> </tr> </table>				☒ Box No. I	Basis of the opinion	☐ Box No. II	Priority	☒ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability	☐ Box No. IV	Lack of unity of invention	☒ Box No. V	Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement	☐ Box No. VI	Certain documents cited	☒ Box No. VII	Certain defects in the international application	☒ Box No. VIII	Certain observations on the international application
☒ Box No. I	Basis of the opinion																		
☐ Box No. II	Priority																		
☒ Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability																		
☐ Box No. IV	Lack of unity of invention																		
☒ Box No. V	Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement																		
☐ Box No. VI	Certain documents cited																		
☒ Box No. VII	Certain defects in the international application																		
☒ Box No. VIII	Certain observations on the international application																		
2. FURTHER ACTION If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered. If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later. For further options, see Form PCT/ISA/220.																			
3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.																			
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476	Date of completion of this opinion 25 July 2008 (25-07-2008)	Authorized officer Jacinth Abraham 819- 934-7598																	

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/CA2008/000979

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:

☒ the international application in the language in which it was filed

☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
☒ on paper
☒ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
☒ contained in the international application as filed.
☒ filed together with the international application in electronic form
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments :

No statement as required in item 4 was furnished.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/CA2008/000979

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application
☒ claim Nos. 1 - 21, 23 - 28, 30 - 37 and 40 - 47

because:

- ☒ the said international application, or the said claim Nos. 1 - 21, 23 - 28, 30 - 37 and 40 - 47 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

Claims 1 - 21, 23 - 28, 30 - 37 and 40 - 47 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, are not required to be searched nor is a written opinion required by this Authority. Regardless, this Authority has established a written opinion based on the alleged effect or purpose/use of the product defined in claims 1 - 21, 23 - 28, 30 - 37 and 40 - 47.

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claim Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos.

- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).

- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

- ☐ See Supplemental Box for further details.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/CA2008/000979

Box No. V	Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement											
1. Statement <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 35%; vertical-align: top;">Novelty (N)</td> <td style="width: 40%; vertical-align: top;"> Claims <u>1 - 60</u> Claims <u>None</u> </td> <td style="width: 25%; vertical-align: top; text-align: right;"> YES NO </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">Inventive step (IS)</td> <td style="vertical-align: top;"> Claims <u>1 - 37 and 40 - 47</u> Claims <u>38, 39 and 48 - 60</u> </td> <td style="vertical-align: top; text-align: right;"> YES NO </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;">Industrial applicability (IA)</td> <td style="vertical-align: top;"> Claims <u>1 - 60</u> Claims <u>None</u> </td> <td style="vertical-align: top; text-align: right;"> YES NO </td> </tr> </table>				Novelty (N)	Claims <u>1 - 60</u> Claims <u>None</u>	YES NO	Inventive step (IS)	Claims <u>1 - 37 and 40 - 47</u> Claims <u>38, 39 and 48 - 60</u>	YES NO	Industrial applicability (IA)	Claims <u>1 - 60</u> Claims <u>None</u>	YES NO
Novelty (N)	Claims <u>1 - 60</u> Claims <u>None</u>	YES NO										
Inventive step (IS)	Claims <u>1 - 37 and 40 - 47</u> Claims <u>38, 39 and 48 - 60</u>	YES NO										
Industrial applicability (IA)	Claims <u>1 - 60</u> Claims <u>None</u>	YES NO										
2. Citations and explanations : Reference is made to the following documents: D1 = WO 2003/074566 A2, (IMMUNOMEDICS, INC), 12 September 2003. The claimed invention is directed to cytotoxic antibodies, including humanized and chimeric antibodies, that recognize the epitope on TROP-2 bound by a monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line deposited with IDAC as accession number 141205-05, and to the use of these antibodies in reducing human breast, prostate, lung, ovarian or colon cancer by complement dependent cytotoxicity (CDC) or antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC), as well as to detect cancer cells by determining expression of TROP-2. D1 discloses a humanized anti-TROP-2 antibody, hRS7, and a chimeric anti-TROP-2 antibody, cRS7, based on the amino acid sequence of the variable heavy chain region (V_H), variable light chain region (V_L) and complementarity determining regions (CDRs) of the parent monoclonal antibody RS7. TROP-2 is referred to as epithelial glycoprotein 1 (EGP-1) in D1. D1 discloses the use of these antibodies in radioimmunotherapy of cancer, where the antibody binds specifically to cancer cells while an attached radiolabel is cytotoxic, thereby treating the cancer. D1 also discloses the use of these antibodies in diagnosing cancer by detecting the expression of TROP-2 on cells. The amino acid sequence of the CDRs of the RS7 monoclonal antibody are as follows: Heavy chain CDR1 - NYGMN Heavy chain CDR2 - WINTYTGEPTYTDDFKG Heavy chain CDR3 - GGFSSYWFYFDV Light chain CDR1 - KASQDVSIAVA Light chain CDR2 - SASRYT Light chain CDR3 - QQHYITPLT Novelty (Article 33(2) of the PCT) Claims 1 - 60 are novel and do comply with Article 33(2) of the PCT. D1 is considered the closest prior art and discloses a monoclonal antibody, RS7, as well as a humanized and a chimeric form of this monoclonal antibody, that recognize TROP-2. The subject matter of claims 1 - 60 differs from D1 in specifying a different monoclonal antibody, produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05, and its humanized form that do not appear to be previously disclosed in the prior art. Though the light chain CDR1, CDR2 and CDR3 and the heavy chain CDR1 of the monoclonal antibody RS7 of D1 and the 141205-05 monoclonal antibody of the present application have identical amino acid sequences, their heavy chain CDR2 and CDR3 differ by four and one amino acids, respectively. While it is likely that both the RS7 and 141205-05 antibodies recognize the same epitope on TROP-2, it is impossible to make a comparison at this time as D1, unlike the present application, does not specify the epitope on TROP-2 to which the RS7 monoclonal antibody binds. Continued in a supplemental box.												

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/CA2008/000979

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted :

Certain pages of the description and claims do not comply with Rule 11.12 of the PCT. Each sheet shall be reasonably free from erasures and shall be free from alterations, overwritings and interlineations. The sentence bridging pages 34 and 35, as well as lines 5 and 6 on page 35 of the description, and references to SEQ ID NOs in claims 51 - 56, have a dark shade over the print that nearly obscures the letters.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/CA2008/000979

Box No. VIII **Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made :

Claims 1, 8, 15, 22, 29, 36 - 39, 47 - 50 and 57 - 60 are broader in scope than the teaching of the description and do not comply with Article 6 of the PCT. There is support in the description only for a monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with IDAC as accession number 141205-05 that is a cancerous disease modifying antibody (CDMAB), and chimeric and humanized forms of this monoclonal antibody (please see the description, page 21, lines 19 - 22; and Examples 8, 9 and 11). There is no support in the description for any other cancerous disease modifying antibody (CDMAB), or for any other monoclonal antibody that binds the same epitope as that bound by the monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with IDAC as accession number 141205-05. Therefore the "CDMAB" in claims 1, 8, 15, 22, 29, 36 - 39, 49, 50 and 57 - 60; the "monoclonal antibody" of claim 48; and the "isolated monoclonal antibody" (other than that produced by hybridoma 141205-05) of claims 49 and 50, and in claims 36, 37 and 47; are broader in scope than the antibodies taught and supported by the description.

Claims 1, 4, 5, 8, 11, 12, 15, 18, 19, 22, 25, 26, 29, 32, 33, 36 - 39, 49, 50 and 57 - 60 do not comply with Article 6 of the PCT. The claims shall be clear and concise. The abbreviation "CDMAB" in these claims lacks clarity, and must be defined as "cancerous disease modifying antibody" at least on its first occurrence in each independent claim. It also appears that this abbreviation is erroneously stated as "CDMBA" in the penultimate line of claim 39. Also, the monoclonal antibodies whose use is claimed in claims 22 and 29 are not defined; the preamble of these claims only defines an epitope of an antigen, but fails to identify or define the monoclonal antibodies whose use is sought.

Claims 1, 8, 15, 36 and 37 do not comply with Article 6 of the PCT. The claims shall be clear and concise. The term "reduction" in the preamble of claims 1, 8, 15, 36 and 37 lacks clarity, as it does not clearly define what aspect of a tumour is reduced - for example: tumour burden, tumour size or tumour aggressiveness. Also, the phrase "human breast ... colon tumor in a mammal" (emphasis added) causes a lack of clarity as it denotes a human tumor in a non-human mammal, or xenografts of a human tumor in a non-human mammal (claims 1, 8 and 15).

Claims 6, 7, 13, 14, 20, 21, 27, 28, 34, 35, 45, 46 and 53 - 56 are broader in scope than the teaching of the description and do not comply with Article 6 of the PCT. There is support only for a monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with IDAC as accession number 141205-05, and chimeric and humanized forms of this monoclonal antibody (please see the description, page 21, lines 19 - 22; and Examples 8, 9 and 11). There is no support in the description for a humanized or a chimeric antibody that is also a monoclonal antibody. Therefore, the "monoclonal antibody is a humanized antibody" (in claims 6, 13, 20, 27, 34 and 45), the "monoclonal antibody is a chimeric antibody" (in claims 7, 14, 21, 28, 35 and 46), and a humanized antibody that is a monoclonal antibody (claims 53 - 56), are broader in scope than the antibodies taught and supported by the description.

Claims 22, 29 and 53 - 56 are unclear and do not comply with Article 6 of the PCT. The following expressions lack a proper antecedent basis:

"said mammal" (claim 22, lines 7 & 8; and claim 29, lines 7 & 9)

"said monoclonal antibody" (claims 53 - 56, lines 1 - 2).

Claims 23 - 28 and 30 - 35 do not comply with Rule 6.4(b) of the PCT as they are improperly dependent on claims 22 and 29, respectively. Any dependent claim shall be construed as including all the limitations contained in the claim to which it refers. Claims 23 - 28 and 30 - 35 are directed to a method, while claims 22 and 29 from which they respectively depend are directed to a use.

Claims 47, 49 and 50 do not comply with Article 6 of the PCT. The claims shall be clear and concise. There are two different "isolated monoclonal antibody" in these claims, causing a lack of clarity as to which of these two is subsequently referred to by the term "said isolated monoclonal antibody" in claims 47 (line 11), 49 (lines 4 - 5 and 6) and 50 (lines 3 - 4 and 5). Further, the entity to which binding of the 141205-05 monoclonal antibody is inhibited by the provided isolated monoclonal antibody in the first step of the method of claim 47 must be specified.

Claim 50 lacks conciseness and does not comply with Article 6 of the PCT for failing to state additional features. The claims should differ from one another. The subject matter of claim 50 appears redundant over that of claim 49.

Claims 53 - 56 do not comply with Article 6 of the PCT. The claims shall be clear and concise. The inclusion of the term "selected" in line 3 of claims 53 - 56 causes a lack of clarity, as this term does not appear to apply to the phrase in which it is found.

Continued in a supplemental box.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/CA2008/000979

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of: V

Inventive Step (Article 33(3) of the PCT)

Claims 38, 39 and 48 - 60 do not comply with Article 33(3) of the PCT. The subject matter described and claimed in these claims would have been obvious to a person skilled in the art or science to which they pertain, having regard to D1. D1 discloses humanized and chimeric anti-TROP-2 antibodies based on the amino acid sequence of the variable heavy chain region (V_H), variable light chain region (V_L) and complementarity determining regions (CDRs) of the parent monoclonal antibody RS7. These antibodies are used in radioimmunotherapy of cancer, where cytotoxicity is mediated by a radiolabel attached to these antibodies. The antibodies of D1 are also used in binding assays to detect cancer cells, by determining expression of TROP-2. It would be obvious to one skilled in the art having regard to D1 to produce an alternate monoclonal antibody that recognizes TROP-2, generate chimeric and humanized antibodies based on the monoclonal antibody, and use these in binding assays to detect expression of TROP-2 on cells. Therefore, the monoclonal antibody of claim 48, the isolated monoclonal antibody of claims 49 and 50, the humanized antibody of claims 51 - 56, the binding assay of claims 38 and 39, the composition of claims 57 - 59 when depending from the antibody of claims 50, 54, 55 and 56, and the assay kit of claim 60, lack an inventive step over D1.

Claims 1 - 37 and 40 - 47 do comply with Article 33(3) of the PCT. The subject matter of these claims is considered to involve an inventive step since the prior art does not fairly suggest or teach a monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05, or humanized forms of this monoclonal antibody, whose administration treats cancer by inducing cytotoxicity in the absence of any attached cytotoxic moiety. While all three of the light chain CDRs and one heavy chain CDR of both the RS7 monoclonal antibody of D1 and the 141205-05 antibody of the present application are identical, it is impossible to determine if both monoclonal antibodies bind the identical epitope or epitopes on TROP-2, since four amino acids of the heavy chain CDR2 and one amino acid of the heavy chain CDR3 differ between them.

Industrial Applicability (Article 33(4) of the PCT)

The subject matter of claims 1 - 60 is considered to be industrially applicable and thus complies with the requirements of Article 33(4) of the PCT. Although the methods per se defined in claims 1 - 21, 23 - 28, 30 - 37 and 40 - 47 relate to subject matter for which this Authority is not required to establish a written opinion, the use of the products referred to therein for cancer treatment and diagnosis appears to represent subject matter that has industrial applicability.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/CA2008/000979

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of: VIII

Claim 60 does not comply with Article 6 of the PCT. The claim shall be clear and concise. The "means" for detecting the binding of the monoclonal antibody of the kit to a polypeptide must be defined in terms of specific components. The term "means" does not serve to clearly define components of a kit. Further, the expression "particular cut-off level" lacks clarity, and is not indicative of the threshold expression of a polypeptide whose expression differentiates cancer cells from normal cells.

The description does not comply with Article 5 of the PCT. The documents referred to on pages 1 - 6 are not fully identified and therefore not accessible by the public. Applicant must fully identify the documents. A document so referred to should be identified by country, number and date for published patent documents, or by title, author, date, and source for non-patent documents.

The description does not comply with Article 5 of the PCT. All documents referred to in the description of an application must be available to the public. Reference to the document on page 16 (line 31), page 17 (lines 8, 16 and 27), page 18 (lines 13 and 29), page 19 (lines 15 and 28), page 20 (lines 8 and 24), page 21 (lines 5 and 18), page 45 (line 14), page 46 (line 15), page 49 (line 22), page 51 (line 24), page 53 (line 16), page 62 (lines 8 and 19), and page 66 (line 23), must be replaced by its corresponding patent number or publication number.

More IPCse:

C07K16/28 (2006.01), *C07K 16/46* (2006.01), *C12P 21/08* (2006.01), *G01N 33/574* (2006.01), *G01N 33.577* (2006.01).

WO 2008/144891

PCT/CA2008/000979

National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada

1015 Arlington Street

Tel: (204) 789-6030

Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2

Fax: (204) 789-2018

Forma Internacional IDAC/BP/4

RECIBO EN EL CASO DE UN DEPOSITO ORIGINAL

(expedido según la Regla 7.1 de las Regulaciones del Tratado de Budapest)

ADJUNTE COPIAS DEL CONTRATO DE DEPOSITO ORIGINAL Y DECLARACION DE VIABILIDAD

Esta Autoridad Depositaria Internacional acepta el depósito del microorganismo especificado a continuación, que fue recibido por ella el 14 de diciembre de 2005

Para (Nombre del Depositante): Valerie Harris

Dirección: ARIUS Research Inc., 55 York Street, Suite 1600, Toronto, ON; M5J 1R7

Identificación del Depósito

Referencia asignada por el depositante: AR47A6.4.2

Número de Adhesión asignado por esta IDA: 141205-05

El depósito identificado anteriormente estaba acompañado por:

☐ una descripción científica (especificar): _____

☐ una designación taxonómica propuesta (especificar): _____

Firma de la persona(s) autorizada para representar a IDAC:

(ilegible)

Fecha: 14 de diciembre de 2005

WO 2008/144891

PCT/CA2008/000979

National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada

1015 Arlington Street

Tel: (204) 789-6030

Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2

Fax: (204) 789-2018

Forma Internacional IDAC/BP/9

DECLARACION DE VIABILIDAD

(expedido según la Regla 10.2 de las Regulaciones del *Tratado de Budapest*)

Parte a Quien se le Expidió la Declaración de Viabilidad

Nombre: Ferris Lander

Dirección: 2855 PGA Boulevard, Palm Beach Gardens, Florida, USA 33410

Depositante

Nombre: Valerie Harris

Dirección: ARIUS Research Inc., 55 York Street, Suite 1600, Toronto, ON; M5J 1R7

Identificación del Depósito

Número de Adhesión asignado por la Autoridad Depositaria Internacional: 141205-05

Fecha del depósito original (o fecha relevante más reciente): 14 de diciembre de 2005

Examen de Viabilidad

La viabilidad del depósito identificado anteriormente fue examinada en (fecha más reciente del examen)

En la fecha identificada anteriormente, el cultivo era:

☒ viable

☐ ya no era viable

Las condiciones bajo la cual se llevó a cabo el Examen de Viabilidad (para ser llenado si la información ha sido solicitada y los resultados del examen fueron negativos):

Firma de la persona(s) autorizada para representar a IDAC: (ilegible)

Fecha: 09 de enero de 2006

WO 2008/144891 ~~Specialty Authority of Canada~~
National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada
1015 Arlington Street
Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2

PCT/CA2008/000979
Tel: (204) 789-6030
Fax: (204) 789-2018

International Form IDAC/BP/4

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
(Issued pursuant to Rule 7.1 of the *Budapest Treaty Regulations*)

ATTACH COPIES OF THE ORIGINAL DEPOSIT CONTRACT AND VIABILITY STATEMENT

This International Depository Authority accepts the deposit of the microorganism specified below, which was received by it on December 14, 2005

To (Name of Depositor): Valerie Harris

Address: ARIUS Research Inc., 55 York Street, Suite 1600, Toronto, ON, M5J 1R7

Identification of Deposit

Reference assigned by depositor: AR47A6.4.2

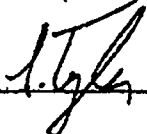
Accession Number assigned by this IDA: 141205-05

The deposit identified above was accompanied by:

☐ a scientific description (specify): _____

☐ a proposed taxonomic designation (specify): _____

Signature of person(s) authorized to represent IDAC:



Date: December 14, 2005

...WO 2008/144891-
National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada
1015 Arlington Street
Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2

PCT/CA2008/000979
Tel: (204) 789-6030
Fax: (204) 789-2018

International Form IDAC/BP/9

STATEMENT OF VIABILITY

(Issued pursuant to Rule 10.2 of the *Budapest Treaty* Regulations)

Party to Whom the Viability Statement is Issued

Name: Ferris Lander

Address: 2855 PGA Boulevard, Palm Beach Gardens, Florida, USA 33410

Depositor

Name: Valerie Harris

Address: ARIUS Research Inc., 55 York Street, Suite 1600, Toronto, ON, M5J 1R7

Identification of the Deposit

Accession Number given by the International Depository Authority: 141205-05

Date of the original deposit (or most recent relevant date): December 14, 2005

Viability Test

The viability of the deposit identified above was tested on (most recent test date)

On the date indicated above, the culture was:

☒ viable

☐ no longer viable

Conditions under which the Viability Test were performed (to be filled in if the information has been requested and the results of the test were negative):

Signature of person(s) authorized to represent IDAC

[Signature]
Date: January 09, 2006

Statement of Viability 1/1

File number: 084 (05)

**ANTICUERPOS ANTI-TROP-2 HUMANIZADOS Y QUIMÉRICOS QUE MEDIAN
CITOTOXICIDAD DE CELULAS CANCEROSAS**

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5 La expresión de TROP-2, una proteína de transmembrana de aproximadamente 35 kDa y un substrato de proteína cinasa C, ha estado ligada a varios cánceres. TROP-2 se conoce también como GAT733-1, glicoproteína epitelial 1 (EGP-I) y transductor de señal de calcio asociado a tumor 2.

10 Un anticuerpo monoclonal contra TROP-2 del hibridoma AR47A6.4.2, depositado en la Autoridad Depositaria Internacional de Canadá (IDAC) con el número de registro 141205-05, mostró previamente ser un anticuerpo modificador de enfermedades cancerosas (CDMAB), previniendo el crecimiento de

15 tumores y reduciendo la carga tumoral en varios modelos de cáncer incluyendo cáncer de próstata, pancreático y seno por citotoxicidad. Las regiones variables de este anticuerpo monoclonal también fueron aisladas, secuenciadas y se determinaron sus regiones de determinación de

20 complementariedad (CDRs). Ahora, se genera un anticuerpo quimérico y anticuerpos humanizados que tienen actividad de unión a TROP-2 similar a la del anticuerpo monoclonal 141205-05 progenitor. Los anticuerpo monoclonales, quiméricos y humanizados pueden ser conjugados a toxinas, enzimas,

25 compuestos radioactivos, citocinas, interferones, porciones objetivo o reporteras y células hematógenas para tratar cáncer. Estos anticuerpos también se usan en ensayos de unión para determinar la expresión de TROP-2 en células.

**ANTICUERPOS ANTI-TROP-2 HUMANIZADOS Y QUIMÉRICOS QUE MEDIAN
CITOTOXICIDAD DE CELULAS CANCEROSAS**

Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

15 TROP-2 es una glicoproteína de superficie celular
expresada en la mayoría de los carcinomas, así como en algunos
tejidos humanos normales. Se definió inicialmente como una
molécula reconocida por dos anticuerpos monoclonales de murino
desarrollados contra una línea de células de coriocarcinoma
20 humano BeWo que reconocía un antígeno sobre células de
trofoblasto humano (Faulk 1978). La misma molécula fue
descubierta independientemente por otros investigadores lo
cual llevó a varios nombres que describían al mismo antígeno.
Por consiguiente, TROP-2 también fue referida como GA733-1 y
25 glicoproteína epitelial-1 (EGP-1) (Basu 1995, Fornaro 1995).

El gen TROP-2 es un gen sin intrones que se creía se había formado a través de la retroposición de un gen homólogo GA733-2 (también conocido como *glicoproteína epitelial-2*, *epCAM* y *Trop-1*) por medio de un intermediario de ARN. El gen

5 *TROP-2* ha sido mapeado al cromosoma 1p32 (Calabrese 2001). El componente proteico de TROP-2 tiene una masa molecular de aproximadamente 35 kilodaltons. Su masa puede ser incrementada en 11-13 kilodaltons con la glicosilación N-enlazada heterogénea de su dominio extracelular. Hay muchos

10 residuos de cisteína en el dominio extracelular que podrían formar sitios de puentes de disulfuro. TROP-2 es un substrato para proteína cinasa C, una proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} y el residuo de serina 303 intracelular ha mostrado ser fosforilado (Basu 1995). También se ha mostrado que el

15 entrelazamiento de TROP-2 con anticuerpos anti-TROP-2 transdujo una señal de calcio como se muestra por una elevación en Ca^{2+} citoplásmico (Ripani 1998). Estos datos soportan la transducción de señales como una función fisiológica de TROP-2, aunque hasta la fecha no se ha

20 identificado ningún ligando fisiológico. Una asociación entre la expresión de TROP-2 y cáncer ha sido mostrada en un reporte en el cual *TROP-2* fue identificado como un miembro de un grupo de genes reportados como siendo los más altamente sobre expresados en carcinoma papilar seroso ovárico en comparación

25 con epitelio ovárico normal en un análisis de expresión génica

a gran escala usando tecnología de microdisposición de ADNc (Santin 2004). Un estudio reciente, que analizaba 74 muestras de cáncer colorrectal humano mediante RT-PCR en tiempo real cuantitativa y 34 de las muestras por inmunohistoquímica, examinó los niveles de expresión de TROP-2 en secciones de pacientes con cáncer y normales. Se encontró que TROP-2 era más altamente expresada en muestras de pacientes con cáncer contra normales, y el estudio demostró además una correlación entre los niveles de expresión de TROP-2 y agresividad biológica. Se encontró que altos niveles de TROP-2 estaban asociados con prognosis deficiente, una reducción en la supervivencia de los pacientes y un incremento en la frecuencia de metástasis hepáticas (Ohmachi 2006), sugiriendo que TROP-2 podría ser útil como un indicador pronóstico y podría ser un objetivo terapéutico atractivo.

El perfil de expresión de TROP-2 ha sido elucidado de inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés) y estudios de citometría de flujo usando muchos anticuerpos TROP-2 diferentes. Anticuerpos anti-TROP-2 162-25.3 y 162-46.2 fueron producidos a través de inmunización de ratones con la línea de células de carcinosarcoma humano BeWo, y se investigaron para su reactividad con una serie de líneas de células tumorales y linfoides y células mononucleares de sangre periférica. En este estudio ambos anticuerpos parecieron ser específicos de trofoblastos, tiñendo tres de

las cuatro líneas de células de coriocarcinoma probadas, mientras que ninguna de las demás líneas de células linfoides o tumorales (que representaban fibrosarcoma, sarcoma cervical, carcinoma de colon, melanoma, neuroblastoma, eritroleucemia) fueron teñidas en un ensayo FACS de inmunofluorescencia indirecta. Además, ninguna de las células de sangre periférica normales fue teñida. Los anticuerpos fueron probados para la tinción de secciones de tejido de placenta incrustadas en parafina fijadas con formalina y secciones normales congeladas de tejidos de hígado, riñón, bazo, timo y nódulos linfáticos. Las secciones tisulares de placenta fueron teñidas con ambos anticuerpos, aunque no hubo tinción de los demás tejidos normales (Lipinksi 1981). Estos dos anticuerpos se han reportado estrictamente para usarse en estudios de diagnóstico *in vitro*.

El anticuerpo anti-TROP-2 MOv16 fue generado a través de la inmunización de ratones con una preparación de membrana cruda de OvCa4343/83 de carcinoma ovárico deficientemente diferenciado. MOv16 se probó para reactividad con una serie de secciones tisulares congeladas de tumores ováricos benignos y malignos. MOv16 reaccionó con 31 de 54 tumores ováricos malignos y 2 de 16 tumores ováricos benignos. De los 3 tumores ováricos mucinosos que fueron probados, MOv16 fue completamente no reactivo. MOv16 también fue probado para reactividad con secciones congeladas de tumores malignos no

ováricos en donde se encontró que se unía a 117 de 189 secciones de carcinoma de seno y 12 de 18 secciones de carcinoma de pulmón. MOv16 fue completamente no reactivo en 16 tumores epiteliales que fueron probados (incluyendo 5 liposarcomas, condrosarcomas, endoteliomas, histiocitomas y disgerminomas). Cuando se probó en secciones de tejido normal congeladas, MOv16 fue reactivo con secciones de seno, páncreas, riñón y próstata. Se reportó que la reactividad de MOv16 era negativa en secciones de pulmón, bazo, piel, ovario, 10 tiroides, glándula parótida, estómago, laringe, útero y colon, aunque no se reportó el número de secciones tisulares que fueron usadas. Los autores notaron que se usaron secciones de tejido congeladas porque MOv16 no fue reactivo para tejidos incrustados en parafina (Miotti 1987). Este anticuerpo 15 también ha sido sólo reportado para usarse en estudios de diagnóstico *in vitro*.

El anticuerpo anti-TROP-2 Rs7-3G11 (RS7) se generó a través de la inmunización de ratones con una preparación de membrana cruda derivada de un carcinoma de células escamosas 20 primario humano del pulmón removido quirúrgicamente. Se usó IHC para examinar la tinción de RS7 en secciones congeladas de tejidos tumorales y normales humanos. RS7 se unió a 33 de las 40 secciones que representaban tumores del cáncer de seno, colon, riñón, pulmón, próstata y células escamosas. De los 25 tejidos normales RS7 se unió a 16 de 20 secciones de tejidos

de seno, colon, riñón, hígado, pulmón y próstata mientras que ninguna de las cinco secciones de tejido de bazo fueron teñidas. En este estudio los autores notaron que parecía que la densidad de antígenos en tumores era más alta que en tejidos epiteliales normales (Stein 1990).

Estudios adicionales de esta especificidad tisular de RS7 se llevaron a cabo en tejidos tanto de tumor como normales. RS7 se probó en un panel de secciones de tumor congeladas y se unió a 65 de las 77 secciones que representaban tumores del pulmón, estómago, riñón, vejiga, colon, seno, ovario, útero y próstata. No hubo unión a los cinco linfomas probados. RS7 se probó en un panel de 85 secciones de tejido humano normales congeladas compuestas de un total de 24 tipos de tejidos. Treinta y nueve secciones de 13 tejidos normales (pulmón, bronquio, traquea, esófago, colon, hígado, páncreas, riñón, vejiga, piel, tiroides, seno y próstata) fueron teñidas por RS7. Los autores de este estudio notaron que en los tejidos en los cuales se observó tinción positiva, la reactividad estaba generalmente restringida a células epiteliales, principalmente en ductos o glándulas. Se notó también que este estudio estaba limitado a secciones congeladas toda vez que se observó que RS7 no era reactivo en secciones incrustadas en parafina fijadas con formalina (Stein 1993).

Anticuerpos anti-TROP-2 policlonales se prepararon

al inmunizar ratones con un péptido sintético que correspondía a las posiciones de aminoácido entre 169 y 182 del dominio citoplásmico de TROP-2 humana. Los anticuerpos policlonales fueron probados en un portaobjetos de disposición tisular que
5 contenía tejidos de hiperplasia y carcinoma esofágico humano fijados con formalina. Diez de los 55 especímenes de carcinoma desplegaron fuerte tinción con los anticuerpos policlonales, mientras que el tejido de hiperplasia leve tiñó muy débilmente, indicando que los niveles de expresión pueden
10 estar relacionados con transformación maligna (Nakashima 2004).

Sobretudo, los patrones de reactividad por IHC obtenidos con diferentes anticuerpos anti-TROP-2 fueron consistentes. La expresión en cáncer se observó
15 principalmente en carcinomas, y la mayoría de los carcinomas fueron reactivos. En tejidos normales, la expresión pareció estar limitada a células de origen epitelial, y hubo cierta evidencia de que la tinción de carcinomas era más fuerte que la tinción de tejidos epiteliales normales correspondientes.

20 Además de ser usado en estudios IHC, el anticuerpo RS7 se probó en modelos *in vivo* con experimentos iniciales que consistían en estudios de dirección a tumor en modelos de xenoinjerto de ratón desnudo. RS7 marcado radiactivamente
25 inyectado intravenosamente mostró acumularse específicamente en el tumor de ratones que portaban tumores ya sea Calu-3

(adenocarcinoma pulmonar) o GW-39 (carcinoma de colon) (Stein 1990). Estudios adicionales se llevaron a cabo para investigar la biodistribución de RS7 marcado radiactivamente en un sistema de xenoinjerto y para estudiar el potencial terapéutico de RS7 como un inmunoconjugado. En este estudio la eficacia terapéutica de $F(ab')_2$ de RS7 marcado con ^{131}I se investigó en ratones desnudos que portaban xenoinjertos de adenocarcinoma pulmonar humano Calu-3. Tres semanas después de la inoculación de los ratones con células Calu-3, cuando los tumores habían alcanzado un tamaño de aproximadamente 0.3-0.9 gramos, grupos de 6-7 ratones fueron tratados, con una sola dosis intravenosa ya sea de 1.0 mCi de ^{131}I -RS7- $F(ab')_2$ o 1.5 mCi de ^{131}I -RS7- $F(ab')_2$ y se compararon con un grupo similar de ratones de control no tratados. La dosis única de 1.0 mCi de ^{131}I -RS7- $F(ab')_2$ dio como resultado supresión de crecimiento de tumor en aproximadamente 5 semanas, mientras que la única dosis de 1.5 mCi de ^{131}I -RS7- $F(ab')_2$ dio como resultado regresión del tumor, y el tamaño de tumor medio no excedió el tamaño pre-terapia hasta la octava semana después de la inyección de radioanticuerpos. Los ratones que recibieron la dosis de 1.5 mCi de ^{131}I -RS7- $F(ab')_2$ experimentaron una pérdida de peso corporal media de 18.7 por ciento, indicando que había toxicidad asociada con el tratamiento. En este estudio, los efectos del tratamiento con RS7 desnudo o el fragmento $F(ab')_2$ de RS7 no fueron probados

(Stein 1994a). Se hizo otro estudio para probar la eficacia de ^{131}I -RS7 en un modelo de xenoinjerto de cáncer de seno de MDA-MB-468. Grupos de diez ratones que portaban tumores MDA-MB-468 de aproximadamente 0.1 cm^3 fueron tratados con una sola
5 dosis i.v. ya sea de 250 microcuries de ^{131}I -RS7 o 250 microcuries de ^{131}I -Ag8 (un anticuerpo de control igualado por isotipo). Grupos de seis ratones fueron tratados con una sola dosis i.v. de 30 microgramos ya sea de RS7 o Ag8 no marcado. Una regresión completa de los tumores (excepto para un animal
10 que tuvo una reaparición transitoria de tumor) se observó en los animales tratados con ^{131}I -RS7, la cual persistió a lo largo de la duración del periodo de observación de 11 semanas. Regresión de tumor también se observó en ratones tratados con ^{131}I -Ag8, aunque sólo se observó entre 2 semanas y 5 semanas
15 con tumores que ya sea persistían o continuaban creciendo durante el resto del estudio. El crecimiento tumoral de ratones que recibieron RS7 o Ag8 no marcado no fue inhibido y no pareció haber ninguna diferencia en el volumen de tumor medio de ratones tratados con RS7 en comparación con ratones
20 tratados con Ag8. Dos grupos adicionales de 10 ratones que portaban tumores MDA-MB-468 más grandes de aproximadamente $0.2\text{-}0.3\text{ cm}^3$ fueron tratados con una sola dosis ligeramente más alta ya sea de 275 microcuries de ^{131}I -RS7 o 275 microcuries de ^{131}I -Ag8 y se compararon con un grupo similar de ratones no
25 tratados. El volumen del tumor se midió semanalmente durante

15 semanas. Aunque en este caso hubo una diferencia significativa en el crecimiento tumoral entre los ratones tratados con ^{131}I -RS7 en comparación con los ratones no tratados, no hubo diferencia significativa en el crecimiento tumoral de los ratones tratados con ^{131}I -RS7 en comparación con los tratados con ^{131}I -Ag8, indicando que una porción de la eficacia podría haberse debido a efectos no específicos de la radiación. Anticuerpos no marcados no fueron probados en ratones que contenían tumores de 0.2-0.3 cm³ (Shih 1995).

10 Ha habido numerosos estudios adicionales que examinan la eficacia de RS7 como un inmunoconjugado con un intento para seleccionar el radiomarcador óptimo para radioinmunoterapia (Stein 2001a, Stein 2001b, Stein 2003). Una versión humanizada de RS7 también ha sido generada; sin embargo, sólo ha sido probada en modelos de xenoinjerto preclínicos como un radioconjugado (Govindan 2004). Estos estudios muestran efectos positivos similares a los estudios descritos previamente con RS7, sin embargo en un estudio, incluso cuando RS7 radiomarcado fue suministrado a una dosis tolerable máxima determinada previamente, ocurrió toxicidad que llevó a la muerte en algunos ratones (Stein 2001a). Aunque el tratamiento efectivo de tumores de xenoinjerto en ratones se logró con RS7 radiomarcado en esos estudios, RS7 desnudo no fue evaluado.

25 La inmunización de ratones con células de carcinoma

de seno humano H3922 pre-tratadas con neuraminidasa produjo el anticuerpo monoclonal anti-TROP-2 BR110 (como el descrito en la patente de E.U.A. No. 5,840,854, refiérase a la sección Patentes Anteriores). Mediante inmunohistología, usando

5 especímenes de tejido humano congelados, BR110 mostró reaccionar con una amplia gama de especímenes de carcinoma humano incluyendo aquellos del pulmón, colon, seno, ovario, riñón, esófago, páncreas, piel, pulmón y angina. Ninguna sección de tejido normal humano fue probada. Estudios *in*

10 *vitro* demostraron que BR110 no tuvo actividad ADCC o CDC en las líneas de células de carcinoma humano H3396 o H3922. Estudios *in vitro* que analizaban la citotoxicidad de inmunotoxinas BR110 se llevaron a cabo en las líneas de células de cáncer humano H3619, H2987, MCF-7, H3396 y H2981.

15 La EC_{50} para las líneas celulares fue de 0.06, 0.001, 0.05, 0.09 y >5 microgramos/mL respectivamente. No se describieron datos de citotoxicidad para el anticuerpo BR110 desnudo. Ningún dato *in vivo* se describió para el BR110 desnudo o inmunoconjugado.

20 Se ha generado un número de anticuerpos adicionales que se dirigen a TROP-2, tales como MR54, MR6 y MR23 los cuales fueron generados a partir de la inmunización de ratones con la línea de células de cáncer ovárico Colo 316 (Stein 1994b) y anticuerpo T16 el cual se generó mediante la

25 inmunización de ratones con la línea de células de cáncer de

vejiga T24 (Fradet 1984). El uso de estos anticuerpos ha estado limitado a la caracterización bioquímica del antígeno de TROP-2 y estudios de expresión de líneas celulares y tejidos. No ha habido reportes de la eficacia anticáncer de
5 estos anticuerpos, ya sea *in vitro* o *in vivo*. RS7 fue el único anticuerpo que se probó para eficacia terapéutica en modelos de cáncer preclínicos, con su uso siendo limitado a un portador de radioisótopo. No hay reportes de que ningún anticuerpo TROP-2 desnudo exhibe eficacia terapéutica en
10 estudios clínicos o en modelos de cáncer preclínicos ya sea *in vitro* o *in vivo*.

Anticuerpos Monoclonales como Terapia de Cáncer: cada individuo que se presenta con cáncer es único y tiene un cáncer que es diferente de los demás cánceres al igual que la
15 identidad de esa persona. A pesar de esto, la terapia actual trata a todos los pacientes con el mismo tipo de cáncer, en la misma etapa, de la misma manera. Por lo menos 30 por ciento de estos pacientes fallarán en la terapia de primera línea, llevando entonces a rondas adicionales de tratamiento y a la
20 probabilidad incrementada de falla del tratamiento, metástasis y finalmente, la muerte. Un enfoque superior al tratamiento sería la personalización de la terapia para el individuo particular. La única terapia actual que lleva en sí misma a personalización es la cirugía. La quimioterapia y el
25 tratamiento con radiación no pueden ser diseñados para el

paciente, y la cirugía en sí misma, en la mayoría de los casos es inadecuada para producir curas.

Con la llegada de los anticuerpos monoclonales, la posibilidad de desarrollar métodos para la terapia personalizada se hizo más realista toda vez que cada anticuerpo puede ser dirigido a un solo epítopo. Además, es posible producir una combinación de anticuerpos que sean dirigidos a la constelación de epítopos que definen únicamente el tumor de un individuo particular.

Habiendo reconocido que una diferencia significativa entre células cancerosas y normales es que las células cancerosas contienen antígenos que son específicos para células transformadas, la comunidad científica ha sostenido por mucho tiempo que anticuerpos monoclonales pueden ser diseñados para dirigirse específicamente a células transformadas al unirse específicamente a estos antígenos cancerosos; dando entonces origen a la creencia de que los anticuerpos monoclonales pueden servir como "balas mágicas" para eliminar células cancerosas. Sin embargo, se reconoce ahora ampliamente que ni un solo anticuerpo monoclonal puede servir en todos los casos de cáncer, y que los anticuerpos monoclonales pueden ser desplegados, como una clase, como tratamientos contra cáncer dirigidos. Los agentes de bloqueo aislados de acuerdo con las enseñanzas de la invención actualmente descrita han mostrado modificar el proceso de

enfermedad cancerosa de una manera que es benéfica para el paciente, por ejemplo, al reducir la carga tumoral, y variadamente serán referidos en la presente como anticuerpos modificadores de enfermedades cancerosas (CDMAB, por sus siglas en inglés) o anticuerpos "anticáncer".

Actualmente, el paciente de cáncer normalmente tiene pocas opciones de tratamiento. El enfoque de regímenes para terapia de cáncer ha producido mejoras en los índices globales de supervivencia y morbilidad. Sin embargo, para el individuo particular, estas estadísticas mejoradas no necesariamente se correlacionan con una mejora en su situación personal.

Así, si se pusiera en práctica una metodología que hiciera posible al practicante tratar cada tumor independientemente de los demás pacientes en la misma cohorte, esto podría permitir el enfoque único de diseñar una terapia sólo para esa persona en particular. Este curso de terapia, idealmente, incrementaría el índice de curas y produciría mejores resultados, satisfaciendo de esta manera una necesidad sentida por mucho tiempo.

Históricamente, el uso de anticuerpos monoclonales ha sido usado con éxito limitado en el tratamiento de cánceres humanos. Linfomas y leucemias han sido tratados con plasma humano, pero hubo pocas remisiones o respuestas prolongadas. Más aún, hubo una falta de reproducibilidad y no hubo beneficio adicional en comparación con quimioterapia. Tumores

sólidos tales como cánceres de seno, melanomas y carcinomas de células renales también han sido tratados con sangre humana, suero de chimpancé, plasma humano y suero de caballo con resultados impredecibles e inefectivos correspondientemente.

5 Ha habido muchas pruebas clínicas de anticuerpos monoclonales para tumores sólidos. En los 80 hubo por lo menos cuatro pruebas clínicas de cáncer de seno humano que produjeron sólo una persona que respondió de por lo menos 47
10 pacientes usando anticuerpos contra antígenos específicos o con base en selectividad tisular. No fue sino hasta 1998 que hubo una prueba clínica exitosa usando un anticuerpo anti-Her2/neu humanizado (Herceptin®) en combinación con cisplatino. En esta prueba 37 pacientes fueron evaluados para respuestas de los cuales aproximadamente un cuarto tuvieron un
15 índice de respuesta parcial y un cuarto adicional tuvo progresión de enfermedad menor o estable. El tiempo a progresión medio entre los que respondieron fue de 8.4 meses con una duración de respuesta media de 5.3 meses.

 Herceptin® fue aprobado en 1998 para uso de primera
20 línea en combinación con Taxol®. Los resultados de estudios clínicos mostraron un incremento en el tiempo medio a progresión de enfermedad para aquellos que recibieron terapia con anticuerpo más Taxol® (6.9 meses) en comparación con el grupo que recibió solamente Taxol® (3.0 meses). Hubo también
25 un ligero incremento en supervivencia media; 22 contra 18

meses para el brazo de tratamiento de Herceptin® más Taxol® contra el brazo de únicamente tratamiento con Taxol®. Además, hubo un incremento en el número de los que respondieron tanto completamente (8 contra 2 por ciento) como parcialmente (34
5 contra 15 por ciento) en el grupo de combinación de anticuerpo más Taxol® en comparación con Taxol® solo. Sin embargo, el tratamiento con Herceptin® y Taxol® llevó a una incidencia más alta de cardiotoxicidad en comparación con el tratamiento con Taxol® solo (13 contra 1 por ciento respectivamente).

10 Asimismo, la terapia con Herceptin® solo fue efectiva para pacientes quienes sobre expresaban (según se determinaba mediante análisis de inmunohistoquímica (IHC)) al receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (Her2/neu), un receptor que actualmente no tiene función conocida o ligando

15 biológicamente importante; aproximadamente 25 por ciento de los pacientes que tienen cáncer de seno metastásico. Por lo tanto, sigue existiendo una gran necesidad no satisfecha para los pacientes con cáncer de seno. Incluso aquellos que pudieran beneficiarse del tratamiento con Herceptin® aún

20 requerirían de quimioterapia y en consecuencia aún tendrían que manejar, al menos hasta cierto grado, los efectos secundarios de este tipo de tratamiento.

Las pruebas clínicas que investigan cáncer colorrectal incluyen anticuerpos contra objetivos tanto de
25 glicoproteína como glicolípidos. Anticuerpos tales como 17-

1A, el cual tiene cierta especificidad para neocarcinomas, ha sufrido pruebas clínicas Fase II en más de 60 pacientes sólo con 1 paciente habiendo tenido una respuesta parcial. En otras pruebas, el uso de 17-1A produjo solo una respuesta
5 completa y dos respuestas menores entre 52 pacientes en protocolos usando ciclofosfamida adicional. Hasta la fecha, pruebas clínicas Fase III de 17-1A no han demostrado eficacia mejorada como terapia adyuvante para cáncer de colon en etapa III. El uso de un anticuerpo monoclonal murino humanizado
10 aprobado inicialmente para formación de imágenes tampoco produjo regresión de tumor.

Solo recientemente ha habido resultados positivos a partir de estudios clínicos en cáncer colorrectal con el uso de anticuerpos monoclonales. En 2004, ERBITUX® fue aprobado
15 para el tratamiento de segunda línea de pacientes con cáncer colorrectal metastásico que expresaba EGFR quienes eran resistentes a tratamiento a quimioterapia a base de irinotecano. Resultados tanto de un estudio clínico Fase II de dos brazos como de un estudio de un solo brazo mostraron
20 que ERBITUX® en combinación con el irinotecano tuvo un índice de respuesta de 23 a 15 por ciento respectivamente con un tiempo a progresión de enfermedad medio de 4.1 a 6.5 meses respectivamente. Los resultados del mismo estudio clínico Fase II de dos brazos y otro estudio de un solo brazo
25 mostraron que el tratamiento con ERBITUX® sólo dio como

resultado un índice de respuesta del 11 a 9 por ciento respectivamente con un tiempo a progresión de enfermedad medio de 1.5 y 4.2 meses respectivamente.

En consecuencia, tanto en Suiza como en los Estados Unidos, el tratamiento con ERBITUX® en combinación con irinotecano, y en los Estados Unidos, el tratamiento con ERBITUX® solo, ha sido aprobado como un tratamiento de segunda línea para pacientes con cáncer de colon quienes han fallado en la terapia de primera línea con irinotecano. Por lo tanto, al igual que Herceptin®, el tratamiento en Suiza sólo está aprobado como una combinación de anticuerpos monoclonales y quimioterapia. Además, el tratamiento tanto en Suiza como en Estados Unidos sólo fue aprobado para pacientes como una terapia de segunda línea. Asimismo, en 2004, AVASTIN® fue aprobado para usarse en combinación con quimioterapia a base de 5-fluoruroacilo intravenoso como un tratamiento de primera línea de cáncer colorrectal metastásico. Los resultados de estudios clínicos Fase III mostraron una prolongación en la supervivencia media de pacientes tratados con AVASTIN® más 5-fluoruroacilo en comparación con pacientes tratados con 5-fluoruroacilo solo (20 meses contra 16 meses respectivamente). Sin embargo, de nuevo al igual que el tratamiento con Herceptin® y ERBITUX® sólo es aprobado como una combinación de anticuerpos monoclonales y quimioterapia.

También siguen habiendo resultados deficientes para

cáncer de pulmón, cerebro, ovarios, pancreático, próstata y estómago. Los resultados recientes más promisorios para cáncer pulmonar no microcítico de una prueba clínica Fase II en donde el tratamiento implicó un anticuerpo monoclonal (SGN-15; dox-BR96, anti-Sialil-LeX) conjugado al fármaco eliminador de células doxorubicina en combinación con el agente quimioterapéutico TAXOTERE®. TAXOTERE® es la única quimioterapia aprobada por la FDA para el tratamiento de segunda línea de cáncer pulmonar. Los datos iniciales indican una supervivencia general mejorada en comparación con TAXOTERE® solo. De los 62 pacientes que fueron reclutados para el estudio, dos tercios recibieron SGN-15 en combinación con TAXOTERE® mientras que el tercio restante recibió TAXOTERE® solo. Para los pacientes que recibieron SGN-15 en combinación con TAXOTERE®, la supervivencia total media fue de 7.3 meses en comparación con 5.9 meses para pacientes que recibieron TAXOTERE® solo. La supervivencia total después de 1 año y 18 meses fue de 29 y 18 por ciento respectivamente para pacientes que recibieron SGN-15 más TAXOTERE® comparada con 24 y 8 por ciento respectivamente para pacientes que recibieron TAXOTERE® solo. Se planean pruebas clínicas adicionales.

Preclínicamente, ha habido cierto éxito limitado en el uso de anticuerpos monoclonales para melanoma. Muy pocos de estos anticuerpos han alcanzado pruebas clínicas y hasta la

fecha ninguno ha sido aprobado o demostrado resultados favorables en pruebas clínicas Fase III.

El descubrimiento de fármacos nuevos para tratar enfermedades es obstaculizado por la falta de identificación de objetivos relevantes entre los productos de 30,000 genes conocidos que contribuirían a la patogénesis de la enfermedad. En investigación oncológica, los objetivos de fármaco potenciales se seleccionan comúnmente simplemente debido al hecho de que son sobre-expresados en células tumorales. Los objetivos identificados de esta manera son después tamizados para su interacción con una multitud de compuestos. En el caso de terapias con anticuerpos potenciales, estos compuestos candidatos normalmente se derivan de métodos tradicionales de generación de anticuerpos monoclonales de acuerdo con los principios fundamentales expuestos por Kohler y Milstein (1975, Nature, 256, 495-497, Kohler and Milstein). Células esplénicas son tomadas de ratones inmunizados con antígeno (por ejemplo, células enteras, fracciones de células, antígeno purificado) y fusionadas con socios de hibridoma inmortalizados. Los hibridomas resultantes son tamizados y seleccionados para secreción de anticuerpos que se unen más ávidamente al objetivo. Muchos anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico dirigidos contra células cancerosas, incluyendo Herceptin® y RITUXIMAB, se han producido usando estos métodos y seleccionado con base en su afinidad. Las fallas en esta

estrategia son dobles. Primero, la elección de los objetivos adecuados para unión a anticuerpos terapéuticos o de diagnóstico es limitada por la escasez de conocimiento que rodea los procesos en carcinógenos específicos de tejido y los
5 métodos simplistas resultantes, tales como selección por sobre expresión, mediante los cuales estos objetivos son identificados. Segundo, la suposición de que la molécula de fármaco que se une al receptor con la afinidad más grande normalmente tiene la probabilidad más alta de iniciar o
10 inhibir una señal podría no siempre ser el caso.

A pesar de cierto progreso con el tratamiento de cáncer de seno y colon, la identificación y desarrollo de terapias de anticuerpo eficaces, ya sea como agentes individuales o co-tratamientos, han sido inadecuados para
15 todos los tipos de cáncer.

Patentes Anteriores:

La patente de E.U.A. No. 5,750,102 describe un proceso en el que células del tumor de un paciente son transfectadas con genes MHC que pueden ser clonados de células
20 o tejido del paciente. Estas células transfectadas son después usadas para vacunar al paciente.

La patente de E.U.A. No. 4,861,581 describe un proceso que comprende las etapas de obtener anticuerpos monoclonales que sean específicos para el componente celular
25 interno de células neoplásicas y normales del mamífero pero no

componentes externos, marcar el anticuerpo monoclonal, poner en contacto el anticuerpo marcado con el tejido de un mamífero que haya recibido terapia para matar células neoplásicas y determinar la efectividad de la terapia al medir la unión del anticuerpo marcado al componente celular interno de las células neoplásicas degenerantes. En la preparación de anticuerpos dirigidos contra antígenos intracelulares humanos, el cesionario de la patente reconoce que las células malignas representan una fuente conveniente de estos antígenos.

10 La patente de E.U.A. No. 5,171,665 proporciona un anticuerpo nuevo y método para su producción. Específicamente, la patente enseña la formación de un anticuerpo monoclonal que tiene la propiedad de unirse fuertemente a un antígeno proteico asociado con tumores humanos, por ejemplo, aquéllos del colon y pulmón, mientras que se une a células normales a un grado mucho menor.

La patente de E.U.A. No. 5,484,596 proporciona un método de terapia para cáncer que comprende remover quirúrgicamente tejido tumoral de un paciente de cáncer humano, tratar el tejido tumoral para obtener células tumorales, irradiar las células tumorales para que sean viables pero no tumorigénicas y usar estas células para preparar una vacuna para el paciente capaz de inhibir la recurrencia del tumor primario mientras se inhiben simultáneamente las metástasis. La patente enseña el

desarrollo de anticuerpos monoclonales que son reactivos con antígenos superficiales de células tumorales. Como se muestra en la columna 4, renglones 45 en adelante, los cesionarios de la patente utilizan células tumorales autóctonas en el desarrollo de anticuerpos monoclonales que expresan inmunoterapia específica activa en neoplasia humana.

La patente de E.U.A. No. 5,693,763 enseña un antígeno de glicoproteína característico de carcinomas humanos y que no depende del tejido de origen epitelial.

La patente de E.U.A. No. 5,783,186 está dirigida 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 composiciones farmacéuticas que incluyen estos anticuerpos.

La patente de E.U.A. No. 5,849,876 describe nuevas líneas de células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales contra antígenos de mucina purificados a partir de fuentes de tejido tumoral y no tumoral.

La patente de E.U.A. No. 5,869,268 está dirigida a un método para generar un linfocito humano que produce un anticuerpo específico para un antígeno deseado, un método para producir un anticuerpo monoclonal, así como anticuerpos monoclonales producidos mediante el método. La patente está dirigida particularmente a la producción de un anticuerpo

monoclonal humano anti-HD útil para el diagnóstico y tratamiento de cánceres.

La patente de E.U.A. No. 5,869,045 se refiere a anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, conjugados de anticuerpo e inmunotoxinas de cadena individual reactivos con células de carcinoma humano. El mecanismo mediante el cual estos anticuerpos funcionan es doble, toda vez que las moléculas son reactivas con los antígenos de membrana celular presentes sobre la superficie de carcinomas humanos, y además porque los anticuerpos tienen la capacidad de internarse dentro de las células de carcinoma, después de 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 E.U.A. No. 5,780,033 describe el uso de autoanticuerpos para terapia y profilaxis de tumores. Sin embargo, este anticuerpo es un autoanticuerpo antinuclear de un mamífero envejecido. En este caso, se dice que el autoanticuerpo es un tipo de anticuerpo natural encontrado en el sistema inmunitario. Debido a que el autoanticuerpo proviene de un "mamífero envejecido", no existe la necesidad de que el autoanticuerpo en realidad provenga del paciente que esté siendo tratado. Además, la patente describe un autoanticuerpo antinuclear natural y monoclonal de un mamífero

envejecido, y una línea de células de hibridoma que produce un autoanticuerpo antinuclear monoclonal.

La patente de E.U.A. No. 5,840,854 describe un anticuerpo específico, BR110 dirigido contra GA733-1. Esta
5 patente describe la función *in vitro* para BR110 como un conjugado de inmunotoxinas. No hubo función *in vitro* como un anticuerpo desnudo descrita para este anticuerpo. Tampoco hubo función *in vivo* descrita para este anticuerpo.

La patente de E.U.A. No. 6,653,104 reclama
10 anticuerpos conjugados a inmunotoxinas, incluyendo pero no limitados a RS7, dirigidos contra un huésped de antígenos, incluyendo pero no limitado a EGP-1. La inmunotoxina está limitada a aquellas que poseen actividad ribonucleolítica. Sin embargo, los ejemplos describen solo un anticuerpo
15 conjugado a inmunotoxinas específico, LL2, dirigido contra CD22. No hubo función *in vitro* o *in vivo* para RS7 descrita en esta solicitud.

La solicitud de E.U.A. No. 20040001825A1 describe un anticuerpo específico, RS7 dirigido contra EGP-1. Esta
20 solicitud describe la función *in vitro* para RS7 como un conjugado radiomarcado. No hubo función *in vitro* como un anticuerpo desnudo descrita para este anticuerpo. Esta solicitud describe también la función *in vivo* para RS7 que resulta de un conjugado radiomarcado y no marcado administrado
25 secuencialmente. Sin embargo, este estudio fue limitado a un

paciente y se desconoce si alguna de las funciones observadas se debió al anticuerpo no marcado. No hubo función *in vivo* para RS7 que resultara de la administración del anticuerpo desnudo.

5

Breve descripción de la invención

Esta solicitud utilizad metodología para producir anticuerpos anticáncer específicos de paciente enseñada en la patente de E.U.A. No. 6,180,357 para aislar líneas de células de hibridoma que codifican para anticuerpos monoclonales

10 modificadores de enfermedades cancerosas. Esos anticuerpos pueden elaborarse específicamente para un tumor y hacen entonces posible la personalización de la terapia de cáncer. Dentro del contexto de esta solicitud, los anticuerpos anticáncer que tienen propiedades ya sea de eliminación de

15 células (citotóxicas) o de inhibición del crecimiento de células (citostáticas) serán en adelante referidos como citotóxicos. Estos anticuerpos se pueden usar para ayudar en las etapas y diagnóstico de un cáncer, y se pueden usar para tratar metástasis tumorales. Estos anticuerpos también se

20 pueden usar para la prevención de cáncer a manera de tratamiento profiláctico. A diferencia de los anticuerpos generados de acuerdo con paradigmas de descubrimiento de fármacos tradicionales, los anticuerpos generados de esta manera pueden dirigirse a moléculas y vías que previamente no

25 mostraron ser integrales con el crecimiento y/o supervivencia

de tejido maligno. Más aún, las afinidades de unión de estos anticuerpos son adecuadas para los requerimientos de iniciación de los eventos citotóxicos que podrían no estar disponibles para interacciones de afinidad más fuerte.

- 5 Asimismo, está dentro del alcance de esta invención conjugar modalidades quimioterapéuticas estándares, por ejemplo, radionúclidos, con el CDMAB de la presente invención, enfocándose directamente en el uso de estos quimioterapéuticos. El CDMAB también puede ser conjugado a
- 10 toxinas, porciones citotóxicas, enzimas, por ejemplo, enzimas conjugadas a biotina, citocinas, interferones, porciones objetivo o reporteras o células hematógenas, formando así un conjugado de anticuerpos. El CDMAB también puede usarse sólo o en combinación con uno o más CDMAB/agentes
- 15 quimioterapéuticos.

- El prospecto de tratamiento anticáncer individualizado traerá a colación un cambio en la manera en que un paciente es manejado. Un probable escenario clínico es que una muestra de tumor se obtenga en el momento de la
- 20 presentación, y sea embancada. De esta muestra, el tumor puede ser tipificado a partir de un panel preexistente de anticuerpos modificadores de enfermedades cancerosas. El paciente será clasificado convencionalmente pero los anticuerpos disponibles pueden ser de utilidad en la
- 25 clasificación adicional del paciente. El paciente puede ser

tratado inmediatamente con los anticuerpos existentes, y un panel de anticuerpos específicos para el tumor puede producirse ya sea usando los métodos delineados en la presente o a través del uso de bibliotecas de despliegue de fagos en conjunto con los métodos de tamizado descritos en la presente. Todos los anticuerpos generados se añadirán a la biblioteca de anticuerpos anticáncer toda vez que existe la posibilidad de que otros tumores puedan portar algunos de los mismos epítomos que el que se esté tratado. Los anticuerpos producidos de acuerdo con este método pueden ser útiles para tratar enfermedad cancerosa en un número de pacientes quienes tengan cánceres que se unan a estos anticuerpos.

Además de los anticuerpos anticáncer, el paciente puede seleccionar recibir las terapias actualmente recomendadas como parte de un régimen de tratamiento multimodal. El hecho de que los anticuerpos aislados por medio de la presente metodología sean relativamente no tóxicos para células no cancerosas permite que se usen combinaciones de anticuerpos a altas dosis, ya sea solos, o en conjunto con terapia convencional. El alto índice terapéutico permitirá también el tratamiento adicional en una escala de tiempo corta que debería reducir la probabilidad de emergencia de células resistentes a tratamiento.

Si el paciente es resistente a tratamiento al curso de terapia inicial o desarrolla metástasis, el proceso de

generar anticuerpos específicos para el tumor puede repetirse para un tratamiento adicional. Además, los anticuerpos anticáncer pueden ser conjugados a los glóbulos rojos obtenidos de ese paciente y reinfundidos para el tratamiento de metástasis. Ha habido pocos tratamientos efectivos para 5 cáncer metastásico y las metástasis normalmente auguran un resultado deficiente que da como resultado la muerte. Sin embargo, los cánceres metastáticos normalmente están bien vascularizados y el suministro de anticuerpos anticáncer por 10 glóbulos rojos puede tener el efecto de concentrar los anticuerpos en el sitio del tumor. Incluso antes de las metástasis, la mayoría de las células cancerosas dependen del suministro sanguíneo del huésped para su supervivencia y un anticuerpo anticáncer conjugado a glóbulos puede ser efectivo 15 contra tumores *in situ* también. Como alternativa, los anticuerpos pueden conjugarse a otras células hematógenas, por ejemplo, linfocitos, macrófagos, monocitos, células asesinas naturales, etcétera.

Hay cinco clases de anticuerpos y cada una está 20 asociada con una función que es conferida por su cadena pesada. Se cree generalmente que la eliminación de células cancerosas por anticuerpos desnudos es mediada ya sea a través de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (DAC, por sus siglas en inglés) o citotoxicidad dependiente de 25 complemento (CDC, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, los

anticuerpos IgM e IgG2a de murino pueden activar complemento humano al unirse al componente C-1 del sistema de complemento activando de esta manera la vía clásica de activación de complemento que puede llevar a lisis tumoral. Para
5 anticuerpos humanos los anticuerpos activadores de complemento más efectivos son generalmente IgM e IgG1. Anticuerpos de murino del isotipo IgG2a e IgG3 son efectivos para reclutar células citotóxicas que tienen receptores Fc los cuales llevan a eliminación celular por monocitos, macrófagos, granulocitos
10 y ciertos linfocitos. Los anticuerpos humanos tanto del isotipo IgG1 como IgG3 median ADCC.

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

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

Hay tres mecanismos adicionales de eliminación de células cancerosas mediada por anticuerpos. El primero es el uso de anticuerpos como una vacuna para inducir al cuerpo a producir una respuesta inmunitaria contra el antígeno putativo que resida sobre la célula cancerosa. El segundo es el uso de anticuerpos que se dirijan a receptores de crecimiento e interfieran con su función o para subregular ese receptor de tal forma que su función se pierda efectivamente. El tercero es el efecto de estos anticuerpos en la ligación directa de porciones de superficie celular que puede llevar a muerte celular directa, tal como la ligación de receptores de muerte tales como TRAIL R1 o TRAIL R2, o moléculas de integrina tales como alfa V beta 3 y similares.

La utilidad clínica de un fármaco contra el cáncer se basa en el beneficio del fármaco bajo un perfil de riesgo aceptable para el paciente. En terapia de cáncer la supervivencia ha sido generalmente el beneficio más buscado, sin embargo, existe un número de otros beneficios bien reconocidos además de prolongar la vida. Estos otros beneficios, cuando el tratamiento no afecta adversamente la supervivencia, incluyen paliación de síntomas, protección contra eventos adversos, prolongación en tiempo para la recurrencia o supervivencia libre de enfermedad, y prolongación en tiempo a progresión. Estos criterios son generalmente aceptados y cuerpos reguladores tales como la

Administración Estadounidense de Alimentos y Fármacos (FDA, por sus siglas en inglés) aprueban fármacos que producen estos beneficios (Hirschfeld et al. Critical Reviews in Oncology/Hematology 42:137-143 2002). Además de estos

5 criterios, es bien reconocido que hay otros criterios que pueden presagiar estos tipos de beneficios. En parte, el proceso de aprobación acelerado concedido por la FDA de los Estados Unidos reconoce que existen sustitutos que probablemente predecirán beneficios para el paciente. A

10 partir del año 2003, ha habido 16 fármacos aprobados bajo este proceso, y de estos, cuatro han pasado a aprobación completa, es decir, los estudios de seguimiento han demostrado beneficio directo para los pacientes como el predicho por criterios sustitutos. Un criterio importante para determinar los

15 efectos de un fármaco en tumores sólidos es la determinación 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 (criterios RECIST) para esta evaluación han sido promulgados por los

20 Criterios de Evaluación de Respuesta en el Grupo de Trabajo en Tumores Sólidos, un grupo de expertos internacionales en cáncer. Los fármacos con un efecto demostrado en la carga tumoral, como lo demuestran las respuestas objetivas de acuerdo con los criterios de RECIST, en comparación con el

25 grupo de control adecuado tienden, finalmente, a producir

beneficio directo para el paciente. En el escenario preclínico la carga tumoral es generalmente más directa de evaluar y documentar. Ya que los estudios preclínicos pueden traducirse al escenario clínico, los fármacos que producen supervivencia prolongada en modelos preclínicos tienen la utilidad clínica anticipada más alta. De manera análoga a producir respuestas positivas a tratamiento clínico, los fármacos que reducen la carga tumoral en el escenario preclínico también pueden tener un impacto directo significativo en la enfermedad. Aunque la prolongación de supervivencia es el resultado clínico posterior más buscado a partir del tratamiento con fármacos contra el cáncer, hay otros beneficios que tienen utilidad clínica y es claro que la reducción de la carga tumoral, la cual puede correlacionarse con un retraso en progresión de enfermedad, extiende la supervivencia o ambas, y también puede llevar 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 U.S. 6,180,357 y como se describe en la solicitud de patente de E.U.A. S.N. 11/709,676 los contenidos de cada una de las cuales se incorporan en la presente a manera de referencia, el anticuerpo monoclonal de ratón, AR47A6.4.2 se obtuvo después

de la inmunización de ratones con células de tejido tumoral de ovario humano. El antígeno AR47A6.4.2 fue expresado sobre la superficie celular de una amplia variedad de líneas de células humanas de orígenes tisulares diferentes. La línea de células de cáncer ovárico OVCAR-3 fue susceptible al efecto citotóxico de AR47A6.4.2 *in vitro*.

El resultado de la citotoxicidad de AR47A6.4.2 contra células cancerosas humanas *in vitro* se extendió más al demostrar su actividad antitumoral *in vivo* (como se describe en SN. 11/709,676). AR47A6.4.2 previno el crecimiento tumoral y redujo la carga tumoral en un modelo BxPC-3 profiláctico *in vivo* de cáncer pancreático humano. El día 49 después de la implantación, el último día del tratamiento, el valor tumoral medio en el grupo tratado con AR47A6.4.2 fue 53 por ciento menor que el del grupo de control tratado con control regulador de pH ($p < 0.05$). No hubo señales clínicas de toxicidad a lo largo del estudio. En resumen, AR47A6.4.2 fue bien tolerado y redujo la carga tumoral en este modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático humano.

Para determinar mejor la eficacia de AR47A6.4.2 en el modelo BxPC-3 de cáncer pancreático humano, el anticuerpo fue probado en un modelo de xenoinjerto BxPC-3 establecido (como el descrito en S.N. 11/709,676). AR47A6.4.2 redujo significativamente la carga tumoral en un modelo establecido de cáncer pancreático humano. El día 54, un día después de

que se administrara la última dosis del anticuerpo, los animales tratados con AR47A6.4.2 tuvieron un volumen tumoral medio que fue 40 por ciento del volumen tumoral medio en los animales tratados con control ($p < 0.0001$). Estos resultados corresponden a una T/C media de 30 por ciento para AR47A6.4.2. No hubo señales clínicas de toxicidad a lo largo del estudio. En resumen, AR47A6.4.2 fue bien tolerado y redujo la carga tumoral en este modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático humano establecido. AR47A6.4.2 ha demostrado eficacia en un modelo de cáncer pancreático humano tanto preventivo como establecido.

AR47A6.4.2 ha demostrado efectos anticáncer contra un modelo de cáncer pancreático humano. Para extender este descubrimiento AR47A6.4.2 se probó en el modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático humano PL45 (como el descrito en S.N. 11/79,676). AR47A6.4.2 inhibió completamente el crecimiento tumoral en el modelo profiláctico *in vivo* PL45 de cáncer pancreático humano. El tratamiento con anticuerpo ARIUS AR47A6.4.2 redujo el crecimiento de tumores PL45 en casi 100 por ciento ($p = 0.0005$, prueba t), en comparación con el grupo tratado con regulador de pH, como se determinó en el día 77, 20 después de la última dosis de anticuerpo cuando casi todos los ratones en el grupo tratado con control y anticuerpo estaban vivos. El día 102, 45 días después de la última dosis, todos los ratones en el grupo de control habían sido

retirados del estudio debido al volumen del tumor. Sin embargo, AR47A6.4.2 aún demostró una inhibición casi completa de crecimiento de tumor y 4 ratones (algunos ratones se habían perdido debido a incidentes no relacionados con cáncer) en ese grupo aún estaban vivos. No hubo señales clínicas de toxicidad obvias a lo largo del estudio. En resumen, AR47A6.4.2 fue bien tolerado e inhibió casi completamente el crecimiento del tumor en este modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático humano. El tratamiento con AR47A6.4.2 demostró también supervivencia incrementada en comparación con el tratamiento con regulador de pH. AR47A6.4.2 por lo tanto ha demostrado eficacia en dos modelos diferentes de cáncer pancreático humano.

AR47A6.4.2 ha demostrado propiedades anticáncer contra dos modelos de xenoinjerto de cáncer pancreático humano diferentes. Para determinar la eficacia de AR47A6.4.2 contra un modelo de xenoinjerto de cáncer humano diferente, el anticuerpo se probó en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata PC-3 (como el descrito en S.N. 11/709,676). AR47A6.4.2 inhibió el crecimiento del tumor en el modelo profiláctico *in vivo* PC-3 de células de adenocarcinoma de próstata humano. El tratamiento con anticuerpo ARIUS AR47A6.4.2 redujo el crecimiento de tumores PC-3 en 60.9 por ciento ($p=0.00037$, prueba t), en comparación con el grupo tratado con regulador de pH, como se determinó el día 32

después de cinco dosis de tratamiento con anticuerpo cuando casi todos los ratones en el grupo tratado con control y anticuerpo aún estaban vivos. Todos los ratones en el grupo de control habían sido retirados del estudio el día 47, tres
5 días antes de la última dosis de anticuerpo, debido al volumen del tumor/lesiones. El día 77, 27 días después de la última dosis de anticuerpo, 40 por ciento de los ratones en el grupo tratado con AR47A6.4.2 aún estaban vivos. No hubo señales de toxicidad clínica obvias a lo largo del estudio. En resumen,
10 AR47A6.4.2 fue bien tolerado e inhibió significativamente el crecimiento de tumor en este modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata humano. El tratamiento con anticuerpo demostró también un beneficio de supervivencia en comparación con el grupo de control. AR47A6.4.2 demostró eficacia contra dos
15 indicaciones de cáncer humano diferentes: pancreático y de próstata.

AR47A6.4.2 ha demostrado propiedades anticáncer contra dos modelos humanos de xenoinjerto de cáncer pancreático diferentes y uno de próstata. Para determinar la
20 eficacia de AR47A6.4.2 contra otro modelo de xenoinjerto de cáncer humano, el anticuerpo se probó en un modelo de xenoinjerto de cáncer MCD-7 (como el descrito en S.N. 11/709,676). AR47A6.4.2 redujo el crecimiento de tumor en el modelo profiláctico *in vivo* MCF-7 de cáncer de seno humano.
25 El tratamiento con anticuerpo ARIUS AR47A6.4.2 dio como

resultado un marcado retraso en el crecimiento del tumor. AR47A6.4.2 indujo valores porcentuales T/C que fueron más bajos que 42 por ciento a partir del día 18 al día 35 de tratamiento y cerca de 42 por ciento hasta el día 49 (valor
5 porcentual T/C óptimo de 10.9 por ciento en el día 18). El día 53, después de que se terminó el tratamiento, la eficacia con el tratamiento de AR47A6.4.2 aún fue observada con un T/C de 57 por ciento. Al final del estudio (día 91), 2 ratones del grupo de tratamiento con AR47A6.4.2 siguieron libres de
10 tumor. Un beneficio de supervivencia después del tratamiento estuvo asociado con la administración de AR47A6.4.2. El grupo de control con regulador de pH alcanzó el 100 mortalidad el día 85 después del tratamiento mientras que 33.3 por ciento de los ratones tratados con AR47A6.4.2 aún estaban vivos el día
15 91 después del tratamiento. No hubo señales clínicas de toxicidad a lo largo del estudio. En resumen, AR47A6.4.2 fue bien tolerado, redujo el crecimiento de tumor y proporcionó un beneficio de supervivencia en este modelo de xenoinjerto de cáncer de seno humano. AR47A6.4.2 ha demostrado eficacia
20 contra 3 indicaciones de cáncer humano diferentes: pancreático, de próstata y seno.

AR47A6.4.2 ha demostrado propiedades anticáncer contra dos modelos humanos de xenoinjerto de cáncer pancreático diferentes, uno de próstata y uno de seno. Para
25 determinar la eficacia de AR47A6.4.2 contra otro modelo de

xenoinjerto de cáncer humano, el anticuerpo se probó en un modelo de xenoinjerto de cáncer de colon Colo 205 (como el descrito en S.N. 11/709,676). AR47A6.4.2 inhibió el crecimiento de tumor en el modelo profiláctico *in vivo* Colo 205 de células de adenocarcinoma colorrectal humano. El tratamiento con anticuerpo ARIUS AR47A6.4.2 redujo el crecimiento de tumores Colo 205 en 60.2 por ciento ($p=0.0003851$, prueba t), en comparación con el grupo tratado con regulador de pH, según se determinó el día 27, cuatro días antes de la última dosis de anticuerpo. No hubo señales clínicas obvias de toxicidad a lo largo del estudio. En resumen, AR47A6.4.2 fue bien tolerado e inhibió significativamente el crecimiento tumoral en este modelo de xenoinjerto de cáncer de colon humano. AR47A6.4.2 ha demostrado eficacia contra cuatro indicaciones de cáncer humano diferentes; pancreático, próstata, seno y colon. Los beneficios de tratamiento se observaron en varios modelos bien reconocidos de enfermedad de cáncer humana sugiriendo beneficios farmacológicos y farmacéuticos de este anticuerpo para la terapia en otros mamíferos, incluyendo el hombre. En total, estos datos demuestran que el antígeno AR47A6.4.2 es un antígeno asociado a cáncer y es expresado en células cancerosas humanas, y es un objetivo de cáncer patológicamente relevante.

Como se describió previamente (S.N. 11/709,676),

datos bioquímicos indicaron que el antígeno reconocido por AR47A6.4.2 es TROP-2. Esto fue soportado por estudios que mostraron que un anticuerpo monoclonal (clon 77220.11, R&D Systems, Miniápolis, MN) reactivo contra TROP-2 identifica
5 proteínas que se unieron a AR47A6.4.2 mediante inmunoprecipitación. Además, AR47A6.4.2 reconoció específicamente la forma recombinante de TROP-2 humano mediante Western Immunoblot. El epítipo de AR47A6.4.2 no parece ser dependiente de carbohidratos pero sí parece ser
10 dependiente de conformación. AR47A6.4.2 también demostró unirse a un epítipo distinto de otro anticuerpo anti-TROP-2: AR52A301.5.

Para determinar la utilidad del epítipo AR47A6.4.2, la expresión del antígeno AR47A6.4.2 en secciones de tejido
15 humano normal congeladas (los experimentos no mostraron reactividad de este anticuerpo con tejidos fijados en formalina) se determinó previamente (como se describe en S.N 11/709,676). La unión a 12 órganos normales humanos, ovario, páncreas, tiroides, cerebro (cerebro, cerebelo), pulmón, bazo,
20 útero, cuello del útero, corazón, piel y músculo esquelético se llevó a cabo usando una disposición de tamizado tisular normal humana (Biochain, CA, EUA). La disposición contenía 20 órganos humanos normales; sin embargo, sólo 12 de los órganos fueron interpretables después de la tinción. El anticuerpo
25 AR47A6.4.2 mostró unión predominantemente a tejidos

epiteliales (endotelio de vasos sanguíneos, epitelio folicular de tiroides, epitelio acinar y ductal de páncreas, epitelio alveolar de pulmón y queratinocitos epidérmicos de piel). El anticuerpo mostró también unión equívoca a tejido linfoide del bazo y unión a tejido neural del cerebro. La ubicación celular fue citoplásmica y membranosa con patrón de tinción difuso. AR47A6.4.2 mostró un patrón de unión similar cuando se comparó con un anticuerpo anti-TROP-2 en investigación (clon 77220.11).

Para extender más el beneficio terapéutico de AR47A6.4.2, la frecuencia y localización del antígeno dentro de varios tejidos de cáncer humano y sus secciones de tejido normal correspondientes (10 cánceres de colon y 1 de colon de normal, 7 de cánceres ováricos y 1 de ovario normal, 11 de cánceres de seno y 3 de seno normal, 14 de cánceres pulmonares y 3 de pulmón normal, 13 de cánceres de próstata y 3 de próstata normal y 13 de cánceres pancreáticos y 4 de páncreas normal) también se determinó previamente (como se describe en S.N 11/709,676). AR47A6.4.2 mostró unión moderada a fuerte a 5/10 (50 por ciento), 6/7 (86 por ciento), 10/11 (91 por ciento), 11/14 (79 por ciento), 13/13 (100 por ciento) y 2/13 (15 por ciento) de cánceres de colon, ovario, seno, pulmón, próstata y pancreático, respectivamente. Además, una unión equívoca a débil se observó en 2/10 (20 por ciento), 1/11 (9 por ciento), 3/14 (21 por ciento) y 2/13 (15 por ciento) de

secciones de cáncer de colon, seno, pulmón y pancreático, respectivamente. En todos los tumores probados, la unión fue específica para las células tumorales. Para los tejidos normales correspondientes el anticuerpo mostró unión a 0/1, 5 3/3, 3/3, 3/3 y 4/4 de tejidos de colon, ovario, seno, pulmón, próstata y pancreático normales. Sin embargo, la unión fue predominantemente a los tejidos epiteliales de los órganos normales.

Estudios IHC se llevaron a cabo previamente para 10 caracterizar la reactividad cruzada del antígeno AR47A6.4.2 en tejidos normales congelados de varias especies (como se describe en 11/709,676). AR47A6.4.2 no mostró unión detectable a los tejidos normales probados de ratón, rata, cobayo, cabra, borrego, hámster, pollo, vaca, caballo o cerdo. 15 Para los tejidos de conejo y perro normales, hubo una unión disimilar a aquella observada en los tejidos de humanos correspondientes. Para los tejidos normales de mono cinomolgo, AR47A6.4.2 mostró especificidad tisular similar a la observada en los tejidos normales humanos correspondientes 20 para todos los órganos probados excepto para los ovarios y testículos en los cuales no se observó unión detectable para las secciones de mono cinomolgo. Para los tejidos normales de mono rhesus, AR47A6.4.2 mostró especificidad tisular similar a la observada en tejidos normales humanos correspondientes. 25 Debe notarse que el panel de tejido normal de mono rhesus fue

más pequeño que aquel que se probó para el mono cinomolgo. Con base en los perfiles de tinción, tanto el mono cinomolgo como rhesus tienen distribución de antígeno AR47A6.4.2 similar a la de los tejidos humanos.

5 Para facilitar la producción de quimeras de anticuerpos, los genes que codificaban para las regiones variables de las cadenas tanto pesada como ligera fueron clonados y secuenciados por separado (como se describió previamente en 11/709,676)

10 La presente invención describe el desarrollo y uso de AR47A6.4.2, AR47A6.4.2 híbrido ((ch)AR47A6.4.2) y variantes humanizadas, (hu)AR47A6.4.2. AR47A6.4.2 se identificó por su efecto en ensayos citotóxicos, en modelos de crecimiento de tumor y en prolongar el tiempo de supervivencia en mamíferos

15 que sufren de enfermedad cancerosa. Esta invención representa un avance en el campo de tratamiento del cáncer toda vez que describe, por primera vez, reactivos que se unen específicamente a un epítipo o epítipos presentes sobre la molécula objetivo, TROP-2, y que también tienen propiedades

20 citotóxicas *in vitro*, como un anticuerpo desnudo, contra células tumorales malignas pero no células normales, y las cuales también median directamente, como un anticuerpo desnudo, la inhibición de crecimiento de tumor y la extensión de supervivencia en modelos *in vivo* de cáncer humano. Esto es

25 un avance en relación con cualquier otro anticuerpo anti-TROP-

2 descrito previamente, toda vez que ninguno ha mostrado tener propiedades similares. También proporciona un avance en el campo ya que demuestra claramente, y por primera vez, la implicación directa de TROP-2 en eventos asociados con

5 crecimiento y desarrollo de ciertos tipos de tumores. Representa también un avance en terapia del cáncer toda vez que tiene el potencial de desplegar propiedades anticáncer similares en pacientes humanos. Un avance más es que la inclusión de estos anticuerpos en una biblioteca de

10 anticuerpos anticáncer mejorará la posibilidad de dirigirse a tumores que expresen diferentes marcadores antigénicos mediante la determinación de la combinación adecuada de diferentes anticuerpos anticáncer, para encontrar el más efectivo para dirigirse e inhibir el crecimiento y desarrollo

15 de los tumores.

Ante todo, esta invención enseña el uso del antígeno AR47A6.4.2 como un objetivo para un agente terapéutico, que cuando se administra puede reducir la carga tumoral de un cáncer que exprese el antígeno en un mamífero, y también puede

20 llevar a una supervivencia prolongada del mamífero tratado. Esta invención enseña también el uso de CDMAB (AR47A6.4.2, AR47A6.4.2 híbrido ((ch)AR47A6.4.2) y variantes humanizadas, (hu)AR47A6.4.2), y sus derivados, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y ligandos inductores de citotoxicidad

25 celular de los mismos para dirigirse a su antígeno y reducir

la carga tumoral de un cáncer que exprese el antígeno en un mamífero, y llevar a supervivencia prolongada del mamífero tratado. Además, esta invención enseña también el uso de detectar el antígeno AR47A6.4.2 en células cancerosas que
5 puede ser útil para el diagnóstico, predicción de terapia y prognosis de mamíferos que porten tumores que expresen este antígeno.

En consecuencia, un objetivo de la invención es utilizar un método para producir anticuerpos modificadores de
10 enfermedades cancerosas (CDMAB) desarrollados contra células cancerosas derivadas de un individuo particular, o una o más líneas de células cancerosas particulares, CDMAB que son citotóxicos con respecto a células cancerosas mientras que simultáneamente son relativamente no tóxicos para células no
15 cancerosas, para de esta manera aislar líneas de células de hibridomas y los anticuerpos monoclonales aislados correspondientes y fragmentos de unión a antígeno de los mismos para los cuales sean codificadas las líneas de células de hibridoma.

20 Un objetivo adicional de la invención es enseñar anticuerpos modificadores de enfermedades cancerosas, ligandos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Un objetivo más de la presente invención es producir anticuerpos modificadores de enfermedades cancerosas cuya
25 toxicidad sea mediada a través de toxicidad celular

dependiente de anticuerpos.

Un objetivo adicional de la presente invención es producir anticuerpos modificadores de enfermedades cancerosas cuya toxicidad sea mediada a través de toxicidad celular
5 dependiente de complemento.

Un objetivo adicional de la presente invención es producir anticuerpos modificadores de enfermedades cancerosas cuya citotoxicidad sea una función de su capacidad para catalizar hidrólisis de enlaces químicos celulares.

10 Un objetivo más de la presente invención es producir anticuerpos modificadores de enfermedades cancerosas que sean útiles para un ensayo de unión en diagnóstico, prognosis y monitoreo de cáncer.

Otros objetivos y ventajas de esta invención se
15 harán aparentes a partir de la siguiente descripción en la que se muestra, a manera de ilustración y ejemplo, ciertas modalidades de esta invención.

Breve descripción de las figuras

El archivo de la patente o solicitud contiene por lo
20 menos un dibujo hecho a color. Copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujos a color serán proporcionadas por la oficina una vez que sea solicitadas y se pague la tarifa necesaria.

La figura 1 demuestra el efecto de AR47A6.4.2 en
25 crecimiento de tumor en un modelo de cáncer de seno MDA-MB-231

humano profiláctico. Las líneas punteadas verticales indican el periodo durante el cual el anticuerpo fue administrado intraperitonealmente. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

5 La figura 2 demuestra el efecto de AR47A6.4.2 en supervivencia de ratones en un modelo de cáncer de seno MDA-MB-231 profiláctico. Los puntos de datos representan el porcentaje de supervivencia.

10 La figura 3 demuestra el efecto de AR47A6.4.2 en peso corporal de ratón en un modelo profiláctico de adenocarcinoma de seno MDA-MB-231. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

15 La figura 4 demuestra el efecto de AR47A6.4.2 en crecimiento de tumor en un modelo de cáncer pancreático PL45 humano establecido de una manera de respuesta a dosis. Las líneas punteadas verticales indican el periodo durante el cual el anticuerpo se administró intraperitonealmente. Los puntos de datos representan la media $\pm$ SEM.

20 La figura 5 demuestra el efecto de AR47A6.4.2 en supervivencia de ratones en un modelo de cáncer pancreático PL45 establecido. Los puntos de datos representan el porcentaje de supervivencia.

25 La figura 6 demuestra el efecto de AR47A6.4.2 en peso corporal de ratones en un modelo de cáncer pancreático PL45 establecido. Los puntos de datos representan la media

+/- SEM.

La figura 7 tabula una comparación por IHC de AR47A6.4.2 en varias secciones de tejido de tumor y normales humanas de diferentes microdisposiciones de tejido.

5 Figuras 8A-8F. Micrografías representativas que muestran el patrón de unión en tejido de tumor de seno obtenido con AR47A6.4.2 (figura 8A) o el anticuerpo de control isotipo (figura 8B) y en tejido tumoral de próstata obtenido con AR47A6.4.2 (figura 8C) o el anticuerpo de control de isotipo (figura 8D) y en tejido de tumor pancreático obtenido con AR47A6.4.2 (figura 8E) o el anticuerpo de control de isotipo (figura 8F) de varias microdisposiciones tisulares de tumor humano. La ampliación es 400X para el tejido tumoral de seno y pancreático y 200X para el tejido de tumor de próstata.

15 Figuras 9A-9B. Micrografías representativas que muestran el patrón de unión obtenido con AR47A6.4.2 en tejido de tumor ovárico (figura 9A) o tejido normal ovárico (figura 9B). AR47A6.4.2 mostró fuerte unión al tumor pero no al tejido normal correspondiente. La ampliación es 200X.

20 Figura 10. Lista de cinasas cuya fosforilación es afectada por tratamiento de células BxPC-3 tratadas con AR47A6.4.2 después de estimulación con suero y suplemento.

25 Figura 11. Lista de factores angiogénicos secretados afectados por el tratamiento de células BxPC-3 tratadas con AR47A6.4.2.

La figura 12 demuestra la actividad CDC *in vitro* de AR47A6.4.2 en dos líneas de células cancerosas pancreáticas humanas diferentes; PL45 y BxPC-3.

Figura 13. Unión de AR47A6.4.2 a péptidos CLIPS
5 (SEQ ID NOS 13-32, respectivamente, en orden de aparición) que fueron sintetizados con base en la secuencia de aminoácidos de TROP-2.

Figura 14. Secuencia de aminoácidos de TROP-2
(SEQ ID NO 33). El epítipo discontinuo reconocido por
10 AR47A6.4.2 está contenido dentro de las secuencias subrayadas. Las posiciones de aminoácido 1-274 representan la porción extracelular de TROP-2; las posiciones de aminoácido 275-290 representan la porción transmembrana de TROP-2 y las posiciones de
15 aminoácido 291-232 representan la porción intracelular de TROP-2.

Figura 15. Cebadores usados en amplificación por PCR de la cadena ligera (SEQ ID NOS: 34-52, respectivamente, en orden de aparición).

20 Figura 16. Cebadores usados en amplificación por PCR de la cadena pesada (SEQ ID NOS: 53-68, respectivamente, en orden de aparición).

Figura 17. Secuencia VH de AR47A6.4.2 de ratón (secuencias de nucleótidos y aminoácidos descritas como SEQ ID
25 NOS: 69-70, respectivamente).

Figura 18. Secuencia VL de AR47A6.4.2 de ratón (secuencias de nucleótidos y aminoácidos descritas como SEQ ID NOS: 71-72, respectivamente).

Figura 19. Oligonucleótidos usados para la
5 generación de secuencias VH de AR47A6.4.2 humanizadas quiméricas y variantes (SEQ ID NOS: 73-92, respectivamente, en orden de aparición).

Figura 20. Oligonucleótidos usados para la
10 generación de secuencias VL de AR47A6.4.2 humanizadas quiméricas y variantes (SEQ ID NOS: 93-110, respectivamente, en orden de aparición).

Figura 21. Vectores de expresión de cadena ligera y cadena pesada.

Figuras 22A, 22B y 22C. Variantes VH de AR47A6.4.2
15 humanizado. Las CDRs están subrayadas (SEQ ID NOS: 111-113, 10, 7 y 114, respectivamente, en orden de aparición).

Figuras 23A, 23B y 23C. Variantes VL de AR47A6.4.2 humanizado. Las CDRs están subrayadas (SEQ ID NOS: 115, 9, 8 y 116-177, respectivamente, en orden de aparición).

Figura 24. Actividades de las variantes VH y VL de
20 AR47A6.4.2 humanizado.

Figura 25. Resumen de las constantes de índice de asociación de afinidad de unión (K_a) y constantes de índice de disociación (K_d) de AR47A6.4.2 de murino y varias variantes de
25 (hu)AR47A.6.4.2 a rhTROP-2.

Descripción detallada de la invención

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

5 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 des-inmunizados, quiméricos, de murino o humanizados), composiciones de
10 anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos de cadena individual, diacuerpos, triacuerpos, inmunoconjugados y fragmentos de anticuerpos (véase abajo).

El término "anticuerpo monoclonal" según se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido de una
15 población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurran naturalmente que pudieran estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente
20 específicos, siendo dirigidos contra un solo sitio antigénico. Además, en contraste con preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal es dirigido contra un solo determinante en el
25 antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos

monoclonales son adecuados toda vez que pueden ser sintetizados sin contaminarse por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como siendo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe considerar como requiriendo la producción del anticuerpo mediante algún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usarán de acuerdo con la presente invención pueden elaborarse mediante el método de hibridoma (murino o humano) descrito primero por Kohler et al., *Nature*, 10 256:495 (1975), o se pueden elaborar por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, patente de E.U.A. No. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden ser aislados de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende de preferencia la región de unión a antígeno o variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen anticuerpos de menos de longitud completa, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpo lineales; moléculas de anticuerpo de cadena individual; anticuerpos de cadena individual, moléculas de anticuerpo de un solo dominio, proteínas de fusión, proteínas recombinantes y anticuerpos multiespecíficos

formados a partir de fragmento(s) de anticuerpo.

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

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos intactos pueden asignarse a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos intactos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de estas pueden dividirse más en "subclases" (isotipos, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de anticuerpos son llamados α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Se conocen bien las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas.

Las "funciones efectoras" de anticuerpos se refieren a aquellas actividades biológicas que se pueden atribuir a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos incluyen unión

a Clq; citotoxicidad dependiente de complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; subregulación de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de células B; (BCR, por sus siglas en inglés)), etc.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la cual células citotóxicas no específicas que expresen receptores Fc (FcRs, por sus siglas en inglés) (por ejemplo, células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpos unidos en una célula objetivo y causan posteriormente lisis de la célula objetivo. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan FcγRIII únicamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede llevarse a cabo un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como aquel descrito en la patente de E.U.A. No. 5,500,362 ó 5,821,337. Las células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) y células asesinas naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en

un modelo de animal tal como aquel descrito en Clynes et al. *PNAS* (USA) 95:652-656 (1998).

Las "células efectoras" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y llevan a cabo funciones efectoras. De preferencia, las células expresan al menos FcγRIII y llevan a cabo función efectora de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las células PBMCs y NK. Las células efectoras pueden ser aisladas de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo de sangre o PBMCs 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 Fc de un anticuerpo. El FcR que se prefiere es un FcR humano de secuencia nativa. Más aún, un FcR que se prefiere es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gama) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas de estos receptores. Los receptores de FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor") los cuales tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de las mismas. El receptor FcγRIIA activador contiene un motivo de activación a base de tirosina inmunoreceptor (ITAM, por sus

siglas en inglés) en su dominio citoplásmico. El receptor FcγRIIB inhibidor contiene un motivo de inhibición a base de tirosina inmunoreceptor (ITIM, por sus siglas en inglés) en su dominio citoplásmico. (véase revisión M. en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcRs se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo aquellos que se identificarán en el futuro, son abarcados por el término "FcR" en la presente. El término incluye también el receptor neonatal, FcRn, el cual es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y Kim et al., *Eur. J. Immunol.* 24:2429 (1994)).

15 "Citotoxicidad dependiente de complemento" o "CDC" se refiere a la capacidad de una molécula para lisar un objetivo en presencia de complemento. La vía de activación de complemento es iniciada por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejada con un antígeno cognado. Para evaluar la activación de complemento, se puede llevar a cabo un ensayo CDC, por ejemplo, como el descrito en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

25 El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren

extensamente en 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 uniformemente a lo largo de los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de dominios variables son llamadas regiones estructurales (FRs). Los dominios variables de cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno 4 FRs, que adoptan ampliamente una configuración de láminas β , conectadas por tres regiones hipervariables, las cuales forman asas que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de láminas β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FRs y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que exhiben varias funciones efectoras, tales como participación del anticuerpo en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable" cuando se usa en

la presente se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígenos. La región hipervariable comprende generalmente residuos de aminoácido de una "región de determinación de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) y/o aquellos residuos de un "asa hipervariable" (por ejemplo, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Los residuos de "región de estructural" o "FR" son aquellos residuos de dominio variable que no son los residuos de región hipervariable como los definidos en al presente. La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados "Fab", cada uno con un solo sitio 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 que aún es capaz de entrelazar antígenos.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación no covalente estrecha. Es en esta configuración que las tres regiones hipervariables de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L . Colectivamente, las seis regiones hipervariables contienen especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres regiones hipervariables específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígenos, aunque a una afinidad más baja que el sitio de unión completo. El fragmento Fab contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH I) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de fragmentos Fab por la adición de pocos residuos en el término carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región de pivote del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente para Fab' en la cual los residuos de cisteína de los dominios constantes portan al menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ fueron producidos originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de pivote entre ellos. Otros acoplamientos

químicos de fragmentos de anticuerpo también se conocen.

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

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena individual" o "scFv" comprenden los dominios V_H - V_L de anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una
10 sola cadena de polipéptidos. De preferencia, el polipéptido Fv comprende además un enlazador de polipéptidos entre los dominios V_H - V_L que hace posible que el scFV forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de scFV véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal*
15 *Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpo" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, fragmento que comprenden un dominio pesado variable (V_H)
20 conectado a un dominio ligero variable (V_L) en la misma cadena de polipéptidos (V_H - V_L). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareo entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de
25 unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más

completamente, por ejemplo, en EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

El término "triacuerpos" o "trímeros trivalentes" se refiere a la combinación de tres anticuerpos de una sola cadena. Los triacuerpos se construyen con el término de aminoácido de un dominio V_L o V_H , es decir, sin ninguna secuencia enlazadora. Un triacuerpo tiene tres cabezas F_v con los polipéptidos dispuestos en una forma cíclica de cabeza a cola. Una conformación posible de triacuerpo es plana con los tres sitios de unión ubicados a un ángulo de 120° unos de otros. Los triacuerpos pueden ser monoespecíficos, biespecíficos o triespecíficos.

Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes toda vez que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, ordinariamente, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo "que se une" a un antígeno de interés,

por ejemplo, antígeno TROP-2, es uno capaz de unirse a ese antígeno con afinidad suficiente de tal manera que el anticuerpo sea útil como un agente terapéutico o de diagnóstico en dirigirse a una célula que exprese el antígeno.

5 Cuando el anticuerpo es uno que se une a TROP-2, normalmente se unirá de preferencia a TROP-2 a diferencia de otros receptores, y no incluye unión incidental tal como contacto Fc no específico, o unión a modificaciones post-traduccionales comunes a otros antígenos y puede ser uno que no reaccione en
10 forma cruzada de manera significativa con otras proteínas. Los métodos para la detección de un anticuerpo que se une a un antígeno de interés, se conocen en la técnica y pueden incluir pero no están limitados a ensayos tales como FACS, ELISA de células y Western blot.

15 Según se usa en la presente, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo de células" se usan indistintamente, y todas estas designaciones incluyen progenie. Se entiende también que toda la progenie puede no ser precisamente idéntica en contenido de ADN, debido a
20 mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que era tamizada en la célula transformada originalmente. Será claro del contexto cuando se intenten designaciones distintas.

"Tratamiento o tratar" se refiere tanto a
25 tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o

- preventivas, en donde el objetivo es el de prevenir o hacer más lento (reducir) la afección o trastorno patológico seleccionado. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno así como aquellos propensos a
- 5 tener el trastorno o aquellos en quienes el trastorno vaya a ser prevenido. Por consiguiente, el mamífero que será tratado en la presente puede haber sido diagnosticado como teniendo el trastorno o puede estar predispuesto o susceptible al trastorno.
- 10 Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento o muerte celular disregulada. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no están limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia
- 15 o malignidades linfoides. Ejemplos más particulares de estos cánceres incluyen, cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer pulmonar incluyendo cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso
- 20 del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de seno, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal,
- 25 carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas

salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma penil, así como cáncer de cabeza y cuello.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes, tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN®); alquil sulfonatos tales como bisulfan, improsulfan y piposulfan; azidirinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, meifalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliceamicina, carabicina, carnomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina, epirrubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina,

quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina,
 tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-
 metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU);
 análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato,
 5 pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como
 fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina;
 análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-
 azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina,
 doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos
 10 tales como calusterona, propionato de dromostanolona,
 epitioestanol, mepitioestano, testolactona; anti-adrenérgicos
 tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano;
 reabastecedor de ácido fólico tales como ácido frolínico;
 aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico;
 15 amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina;
 demecolcina; diaziquona; elformitina; acetato de eliptinio;
 etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano;
 lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina;
 pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-
 20 etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxano; sizofiran;
 spirogermanio; ácido tenuazonico; triaziquona; 2,2',2"-
 triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina;
 mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobroman;
 gacitocina; arabinosida ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa;
 25 taxanos, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb

Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE®, Aventis, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino;

5 vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibironato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilomitina (DMFO); ácido retinoico;

10 esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. Se incluye también en esta definición los agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas en tumores tales como anti-estrógenos incluyendo, por

15 ejemplo tamoxifen, raloxifen, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromataasa, 4-hidroxitamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY117018, onapristona y toremifen (Fareston); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente

20 aceptables de cualquiera de los anteriores.

"Mamífero" para los propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo humanos, ratones, ratones SCID o desnudos o cepas de ratones, animales domésticos y de granja y animales de

25 zoológico, deportivos o domésticos, tales como borregos,

99

perros, gatos, caballos, vacas, etcétera. De preferencia, el mamífero en la presente es humano.

Los "oligonucleótidos" son polidesoxinucleótidos de cadena corta y de una sola o doble hebra que son químicamente sintetizados por métodos conocidos (tales como química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita, usando técnicas en fase sólida tales como las descritas en EP 266,032, publicada el 4 de mayo de 1988, o por medio de intermediarios de H-fosfonato de desoxinucleósido como los descritos por Froehler et al., *Nucl. Acids Res.*, 14:5399-5407, 1986. Se purifican después en geles de poliacrilamida.

De acuerdo con la presente invención, las formas "humanizadas" y/o "quiméricas" de inmunoglobulinas no humanas (por ejemplo, murinas) se refieren a anticuerpos que contienen inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígenos de anticuerpos) que resultan en la reducción de un anticuerpo anti-ratón humano (HAMA, por sus siglas en inglés), anticuerpo anti-híbrido humano (HACA, por sus siglas en inglés) o un anticuerpo anti-humano humano (HAHA), en comparación con el anticuerpo original, y contienen las porciones necesarias (por ejemplo, CDR(s), regiones de unión a antígeno, dominios variables y así sucesivamente) derivadas de la inmunoglobulina no humana, necesarias para reproducir el efecto deseado,

mientras conservan simultáneamente características de unión que son comparables con las de la inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales

5 residuos de las regiones de determinación de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) del anticuerpo receptor se reemplazan por residuos de las CDRs de una especie no humana (anticuerpo donador) tales como ratón, conejo o rata que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En algunos

10 casos, los residuos de la región estructural (FR, por sus siglas en inglés) Fv de la inmunoglobulina humana son reemplazados por residuos Fv no humanos correspondientes. Más aún, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentren ni en el anticuerpo receptor ni en las

15 secuencias CDR o FR importadas. Estas modificaciones se hacen para refinar y optimizar más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno y típicamente dos, dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente

20 todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas sustancialmente todos los residuos FR son aquéllos de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente comprenderá también al menos una porción de una región

25 constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente aquélla de una

inmunoglobulina humana.

Los anticuerpos "des-inmunizados" son inmunoglobulinas que son no inmunogénicas, o menos inmunogénicas, para una especie dada. La des-inmunización puede lograrse a través de alteraciones estructurales al anticuerpo. Puede emplearse cualquier técnica de des-inmunización conocida por aquellos expertos en la técnica. Una técnica adecuada para des-inmunizar anticuerpos se describe, por ejemplo, en WO 00/34317 publicada el 15 de junio de 2000.

Un anticuerpo que induce "apoptosis" es uno que induce muerte cerebral programada mediante cualquier medio, ilustrado pero no limitado a unión de anexina V, actividad caspasa, fragmentación de ADN, encogimiento celular, dilatación de retículo endoplásmico, fragmentación de células y/o formación de vesículas de membrana (llamadas cuerpos apoptóticos).

Según se usa en la presente "citotoxicidad inducida por anticuerpos" se entiende que significa el efecto citotóxico derivado del sobrenadante o anticuerpo de hibridoma producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05, un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05, un anticuerpo híbrido del anticuerpo monoclonal aislado producido por el

hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05, fragmentos de unión a antígeno o ligandos de anticuerpos de los mismos, cuyo efecto no es necesario en relación con el grado de unión.

- 5 A lo largo de la presente descripción, las líneas de células de hibridoma, así como los anticuerpos monoclonales aislados que se producen de las mismas, son referidos alternativamente por su designación interna, AR47A6.4.2 (murino), (ch)AR47A6.4.2 (híbrido), (hu)AR47A6.4.2 (humanizado) o designación del depositario, IDAC 141205-05.

- 10 Según se usa en la presente "ligando de anticuerpo" incluye una porción que exhibe especificidad de unión al menos para un epítipo del antígeno objetivo, y que puede ser una molécula de anticuerpo intacta, fragmentos de anticuerpo o
- 15 cualquier molécula que tenga 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 Fv, molécula Fab, molécula Fab', molécula F(ab')₂, un anticuerpo biespecífico, una proteína de fusión o cualquier molécula
- 20 genéticamente manipulada que reconozca específicamente y se una al menos a un epítipo del antígeno unido por el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma designada como IDAC 141205-05 (la IDAC de antígeno 141205-05), un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal
- 25 aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con

el número de registro 141205-05, un anticuerpo híbrido del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05 y fragmentos de unión a antígeno.

5 Según se usa en la presente "anticuerpos modificadores de enfermedades cancerosas" (CDMAB) se refiere a anticuerpos monoclonales que modifican el proceso de enfermedades cancerosas de una manera que sea benéfica para el paciente, por ejemplo, al reducir la carga tumoral o prolongar
10 la supervivencia de individuos portadores de tumores, y ligandos de anticuerpo de los mismos.

Un "agente de unión relacionado con CDMAB", en su sentido más amplio, se entiende que incluye, pero no está limitado a, cualquier forma de anticuerpos humanos o no
15 humanos, fragmento de anticuerpo, ligandos de anticuerpo o similares, que se unan competitivamente a por lo menos un epítopo que se dirija a CDMAB.

Un "aglutinante competitivo" se entiende que incluye cualquier forma de anticuerpos humanos o no humanos,
20 fragmentos de anticuerpo, ligandos de anticuerpo o similares que tengan afinidad de unión al menos para un epítopo que se dirija a CDMAB.

Los tumores que se tratarán incluyen tumores primarios y tumores metastásicos, así como tumores resistentes
25 a tratamiento. Los tumores resistentes a tratamiento incluyen

tumores que no responden o son resistentes al tratamiento con agentes quimioterapéuticos solos, anticuerpos solos, radiación sola o combinaciones de los mismos. Los tumores resistentes a tratamiento abarcan también tumores que parecen ser inhibidos por tratamiento con esos agentes pero recurren hasta cinco años, algunas veces hasta diez años o más después de que se descontinúa el tratamiento.

Los tumores que pueden ser tratados incluyen tumores que no son vascularizados, o que aún no son sustancialmente vascularizados, así como tumores vascularizados. Ejemplos de tumores sólidos, los cuales pueden tratarse en consecuencia incluyen carcinoma de seno, carcinoma pulmonar, carcinoma colorrectal, carcinoma pancreático, glioma y linfoma. Algunos ejemplos de estos tumores incluyen tumores epidermoides, tumores escamosos, tales como tumores de cabeza y cuello, tumores colorrectales, tumores de próstata, tumores de seno, tumores pulmonares, incluyendo tumores pulmonares 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 cerebrales, melanoma, carcinomas y sarcomas gastrintestinales y renales, rabdomiosarcoma, glioblastoma, de preferencia glioblastoma multiforme y leiomiosarcoma.

Según se usa en la presente "región de unión a

antígeno" significa una porción de la molécula que reconoce el antígeno objetivo.

Según se usa en la presente "inhibe competitivamente" significa que es capaz de reconocer y unirse a un sitio determinante al cual el anticuerpo monoclonal producido por la línea de células de hibridoma designada como IDAC 141205-05 (el anticuerpo IDAC 141205-05), un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05, un anticuerpo híbrido del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05, fragmentos de unión a antígeno o ligandos de anticuerpos de los mismos es dirigido usando ensayos de competencia de anticuerpos recíprocos convencionales. (Belanger L., Sylvestre C. y Dufour D. (1973), Enzyme linked immunoassay for alpha fetoprotein by competitive and sandwich procedures. Clinica Chimica Acta 48, 15).

Según se usa en la presente "antígeno objetivo" es el antígeno IDAC 141205-05 o porciones del mismo.

Según se usa en la presente, un "inmunoconjugado" significa cualquier molécula o CDMAB tal como un anticuerpo enlazado química o biológicamente a citotoxinas, agentes radioactivos, citocinas, interferones, porciones objetivo o reporteras, enzimas, toxinas, fármacos antitumor o agentes

terapéuticos. El anticuerpo o CDMAB puede ser enlazado a la citotoxina, agente radioactivo, citocina, interferón, porción objetivo o reportera, enzima, toxina, fármaco antitumoral o agente terapéutico en cualquier lugar a lo largo de la molécula siempre y cuando sea capaz de unirse a su objetivo. Ejemplos de inmunoconjugados incluyen conjugados químicos de toxinas de anticuerpos y proteínas de fusión anticuerpo-toxina.

Los agentes radioactivos adecuados para usarse como agentes antitumor se conocen por aquellos expertos en la técnica. Por ejemplo, se usa ^{131}I o ^{211}At . Estos isótopos son fijados al anticuerpo usando técnicas convencionales (por ejemplo, Pedley et al., Br. J. Cancer 68, 69-73 (1993)). Como alternativa, el agente antitumor que es unido al anticuerpo es una enzima que activa un profármaco. Un profármaco puede ser administrado el cual permanecerá en su forma inactiva hasta que alcance el sitio de tumor en donde se convierte en su forma de citotoxina una vez que el complejo de anticuerpos sea administrado. En la práctica, el conjugado anticuerpo-enzima se administra al paciente y se le deja ubicarse en la región del tejido que será tratado. El profármaco es luego administrado al paciente de tal forma que la conversión en el fármaco citotóxico ocurra en la región del tejido que será tratado. Como alternativa, el agente antitumor conjugado al anticuerpo es una citocina tal como interleucina-2 (IL-2),

interleucina-4 (IL-4) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). El anticuerpo dirige la citocina al tumor de tal forma que la citocina medie el daño a o la destrucción del tumor sin afectar otros tejidos. La citocina es fusionada al anticuerpo
5 al nivel ADN usando técnicas de ADN recombinantes convencionales. También se pueden usar interferones.

Según se usa en la presente, una "proteína de fusión" significa cualquier proteína quimérica en la que una
10 región de unión a antígeno se conecte a una molécula biológicamente activa, por ejemplo, toxina, enzima, proteínas fluorescentes, marcador luminiscente, marcador de polipéptidos, citocina, interferón, porción objetivo o reportera o fármaco de proteínas.

La invención contempla además CDMAB de la presente
15 invención al cual se enlazan porciones objetivo o reporteras. Las porciones objetivo son primeros miembros de pares de unión. Los agentes antitumor, por ejemplo, son conjugados a segundos miembros de estos pares y son de esta manera dirigidos al sitio en donde se une la proteína de unión a
20 antígeno. Un ejemplo común de este par de unión es avidina y biotina. En una modalidad preferida, biotina se conjuga al antígeno objetivo del CDMAB de la presente invención, y proporciona de esta manera un objetivo para un agente antitumor u otra porción que sea conjugada a avidina o
25 estreptavidina. Como alternativa, biotina u otra de estas

porciones es enlazada al antígeno objetivo del CDMAB de la presente invención y usada como un reportero, por ejemplo en un sistema de diagnóstico en donde se conjugue un agente productor de señal detectable a avidina o estreptavidina.

5 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 puede detectarse por medios externos, normalmente la medición de radiación electromagnética. En la mayor parte, el agente

10 productor de señal es una enzima o cromóforo, o emite luz por fluorescencia, fosforescencia o quimioluminiscencia. Los cromóforos incluyen colorantes que absorben luz en la región ultravioleta o visible, y pueden ser substratos o productos de degradación de reacciones catalizadas por

15 enzimas.

 Más aún, dentro del alcance de la presente invención se incluye el uso del presente CDMAB *in vivo* en *in vitro* para métodos de investigación o diagnóstico, los cuales se conocen bien en la técnica. Para llevar a cabo los métodos de

20 diagnóstico contemplados en la presente, la presente invención puede incluir además kits, los cuales contengan CDMAB de la presente invención. Estos kits serán útiles para la identificación de individuos en riesgo de cierto tipo de cánceres al detectar sobre expresión del antígeno objetivo de

25 CDMABs sobre células de estos individuos.

Kits para ensayos de diagnóstico

- Se contempla utilizar el CDMAB de la presente invención en forma de un kit para ensayos de diagnóstico para determinar la presencia de un tumor. El tumor generalmente
- 5 será detectado en un paciente con base en la presencia de uno o más antígenos específicos de tumor, por ejemplo proteínas y/o polinucleótidos que codifiquen para estas proteínas en una muestra biológica, tal como sangre, suero, orina y/o biopsias de tumor, muestras que habrán sido obtenidas del paciente.
- 10 Las proteínas funcionan como marcadores que indican la presencia o ausencia de un tumor particular, por ejemplo un tumor de colon, seno, pulmón o próstata. Se contempla además que el antígeno tendrá utilidad para la detección de otros tumores cancerosos. La inclusión en los kits para ensayos de
- 15 diagnóstico de agentes de unión comprendidos de CDMABs de la presente invención, o agentes de unión relacionados con CDMAB, hace posible la detección del nivel de antígeno que se une al agente en la muestra biológica. Cebadores y sondas de polinucleótidos pueden usarse para detectar el nivel de ARNm
- 20 que codifique para una proteína de tumor, lo cual también es indicador de la presencia o ausencia de un cáncer. Para que el ensayo de unión sea diagnóstico, se habrán generado datos que correlacionen niveles estadísticamente significativos de antígeno, en relación con aquéllos presentes en tejido normal,
- 25 para de esta manera hacer el reconocimiento de unión

definitivamente diagnóstico para la presencia de un tumor canceroso. Se contempla que una pluralidad de formatos serán útiles para el ensayo y diagnóstico de la presente invención, como se conoce por aquellos de capacidad ordinaria en la
5 técnica, usando un agente de unión para detectar marcadores polipéptidos en una muestra. Por ejemplo, como se ilustra en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Se contemplan además cualquiera y todas las combinaciones, permutaciones o modificaciones de los
10 formatos de ensayo y diagnóstico descritos arriba.

La presencia o ausencia de un cáncer en un paciente será determinada 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 de polipéptido que
15 se una al agente de unión y (c) comparar el nivel de polipéptidos con un valor límite predeterminado.

En una modalidad ilustrativa, se contempla que el ensayo incluirá el uso de un CDMAB y un agente de unión a base de CDMAB inmovilizado sobre un soporte sólido para unirse a y
20 remover el polipéptido del resto de la muestra. El polipéptido unido puede ser después detectado usando un reactivo de detección que contenga un grupo reportero y se una específicamente al complejo agente de unión/polipéptido. Los reactivos de detección ilustrativos pueden incluir un agente
25 de unión a base de CDMAB que se una específicamente al

polipéptido o un anticuerpo u otro agente que se una específicamente al agente de unión, tal como una anti-inmunoglobulina, proteína g, proteína A o una lectinas. En una modalidad alternativa se contempla que se puede utilizar

5 un ensayo competitivo en el cual un polipéptido sea marcado con un grupo reportero y se le deje unirse al agente de unión inmovilizado después de la incubación del agente de unión con la muestra. Indicador de la reactividad de la muestra con el agente de unión inmovilizado, es el grado al cual los

10 componentes de la muestra inhiben la unión del polipéptido marcado al agente de unión. Los polipéptidos adecuados para usarse dentro de estos ensayos incluyen proteínas específicas de tumor de longitud completa y/o porciones de las mismas, a las cuales tiene afinidad el agente de unión.

15 El kit de diagnóstico será provisto con un soporte sólido que puede estar en forma de cualquier material por aquellos de capacidad ordinaria en la técnica a la cual puede fijarse la proteína. Ejemplos adecuados pueden incluir un pocillo de prueba en una placa de microtitulación o una

20 membrana de nitrocelulosa u otra membrana adecuada. Como alternativa, el soporte puede ser una esfera o disco tal como un material de vidrio, fibra de vidrio, látex o plástico tal como poliestireno o cloruro de polivinilo. El soporte también puede ser una partícula magnética o un sensor de fibra óptica,

25 tal como aquellos descritos, por ejemplo, en patente de E.U.A.

No. 5,539,681.

Se contempla que el agente de unión será inmovilizado sobre el soporte sólido usando una variedad de técnicas conocidas por aquellos de capacidad en la técnica, los cuales se describen ampliamente en la literatura de patente y científica. El término "inmovilización" se refiere tanto a asociación no covalente, tal como adsorción como a fijación covalente, la cual, en el contexto de la presente invención, puede ser un enlace directo entre el agente y grupos funcionales sobre el soporte, o puede ser un enlace por medio de un agente de entrelazamiento. En una modalidad preferida aunque no limitativa, se prefiere la inmovilización por adsorción a un pocillo en una placa de microtitulación o a una membrana. La adsorción puede lograrse al poner en contacto el agente de unión, en un regulador de pH adecuado, con el soporte sólido durante una cantidad de tiempo adecuada. El tiempo de contacto puede variar con temperatura, y generalmente estará dentro de una escala de entre alrededor de 1 hora y aproximadamente 1 día.

La fijación covalente del agente de unión al soporte sólido normalmente se logrará 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 puede fijarse covalentemente a soportes que

tengan un recubrimiento polimérico adecuado usando benzoquinona o mediante condensación de un grupo aldehído sobre el soporte con una amina y un hidrógeno activo en el socio de unión (véase, por ejemplo, Pierce Immunotechnology
5 Catalog and Handbook, 1991, en A12 A13).

Se contempla además que el kit para ensayos de diagnóstico tendrá la forma de un ensayo de emparedado de dos anticuerpos. Este ensayo se puede llevar a cabo al poner en contacto primero un anticuerpo, por ejemplo, el CDMAB
10 actualmente descrito que haya sido inmovilizado sobre un soporte sólido, comúnmente el pocillo de una placa de microtitulación, con la muestra, de tal forma que a los polipéptidos dentro de la muestra se les deje unirse al anticuerpo inmovilizado. La muestra no unida se remueve
15 después de los complejos polipéptido-anticuerpo inmovilizados y se añade un reactivo de detección (de preferencia un segundo anticuerpo capaz de unirse a un sitio diferente en el polipéptido) que contiene un grupo reportero. La cantidad de reactivo de detección que permanece unida al soporte sólido se
20 determina después usando un método adecuado para el grupo reportero específico.

En una modalidad específica, se contempla que una vez que el anticuerpo sea inmovilizado sobre el soporte como se describió arriba, los sitios de unión a proteína restantes
25 en el soporte serán bloqueados, mediante el uso de cualquier

agente de bloqueo adecuado conocidos por aquellos de capacidad ordinaria en la técnica, tal como albúmina de suero bovino o Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). El anticuerpo inmovilizado sería después incubado con la muestra, y el

5 polipéptido se dejaría unirse al anticuerpo. La muestra puede ser diluida con un diluyente adecuado, tal como solución salina de pH regulado con fosfato (PBS) antes de su incubación. En general, un tiempo de contacto adecuado (es decir, tiempo de incubación) se seleccionaría para

10 corresponder un periodo suficiente para detectar la presencia de polipéptido dentro de una muestra obtenida de un individuo con el tumor específicamente seleccionado. De preferencia, el tiempo de contacto es suficiente para lograr un nivel de unión que es de al menos aproximadamente 95% de aquél logrado a

15 equilibrio entre polipéptido unido y no unido. Aquellos de capacidad ordinaria en la técnica reconocerán que el tiempo necesario para lograr el equilibrio puede determinarse fácilmente al ensayar el nivel de unión que ocurre durante un periodo de tiempo.

20 Se contempla además que la muestra no unida sería después removida al lavar el soporte sólido con un regulador de pH adecuado. El segundo anticuerpo, el cual contiene un grupo reportero, sería entonces añadido al soporte sólido. La incubación del reactivo de detección con el complejo

25 anticuerpo-polipéptido inmovilizado sería entonces llevada a

cabo durante una cantidad de tiempo suficiente como para detectar el polipéptido unido. Subsecuentemente, el reactivo de detección no unido sería entonces removido y el reactivo de detección unido sería detectado usando el grupo reportero. El

5 método empleado para detectar el grupo reportero es necesariamente específico para el tipo de grupo reportero seleccionado, por ejemplo para grupos radioactivos, los métodos de conteo por centelleo o autorradiográficos son generalmente adecuados. Se pueden usar métodos
10 espectroscópicos para detectar colorantes, grupos luminiscentes y grupos fluorescentes. La biotina puede detectarse usando avidina, acoplada a un grupo reportero diferente (comúnmente un grupo radioactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos reporteros de enzimas pueden
15 detectarse generalmente mediante la adición de substrato (generalmente durante un periodo de tiempo específico), seguido por el análisis espectroscópico u otro de los productos de reacción.

Para utilizar el kit para ensayos de diagnóstico de
20 la presente invención para determinar la presencia o ausencia de un cáncer, tal como cáncer de próstata, la señal detectada del grupo reportero que sigue unido al soporte sólido generalmente sería comparada con una señal que correspondiera a un valor límite predeterminado. Por ejemplo, un valor
25 límite ilustrativo para la detección de un cáncer puede ser la

señal promedio media obtenida cuando el anticuerpo inmovilizado es incubado con muestras de pacientes sin el cáncer. En general, una muestra que genere una señal que sea aproximadamente tres desviaciones estándares por arriba del

5 valor límite predeterminado se consideraría positiva para el cáncer. En una modalidad alternativa, el valor límite puede determinarse usando una Curva Operadora Receptora, de acuerdo con el método de Sackett et al., Clinical Epidemiology. A Basic Science for Clinical Medicine, Little Brown and Co.,

10 1985, p. 106-7. En esta modalidad, el valor límite podría determinarse a partir de una gráfica de pares de índices verdaderos positivos (es decir, sensibilidad) e índices falsos positivos (especificidad del 100 por ciento) que corresponden a cada valor límite posible para el resultado de la prueba de

15 diagnóstico. El valor límite en la gráfica que es el más cercano a la esquina izquierda superior (es decir, el valor que encierra el área más grande) es el valor límite más preciso, y una muestra que genere una señal que sea más alta que el valor límite determinada mediante este método puede

20 considerarse positiva. Como alternativa, el valor límite puede desplazarse a la izquierda a lo largo de la gráfica, para minimizar el índice falso positivo, o a la derecha, para minimizar el índice falso negativo. En general, una muestra que genere una señal que sea más alta que el valor límite

25 determinado por este método se considera positiva para un

cáncer.

Se contempla que el ensayo de diagnóstico hecho posible por el kit se llevará a cabo ya sea en un formato de paso de flujo o de tira de prueba, en donde el agente de unión
5 es inmovilizado sobre una membrana, tal como nitrocelulosa. En la prueba de paso de flujo, los polipéptidos dentro de la muestra se unen al agente de unión inmovilizado al pasar la muestra a través de la membrana. Un segundo agente de unión marcado se une después al polipéptido de agente de unión y al
10 complejo de agente de unión-polipéptido como una solución que contiene el segundo agente de unión que fluye a través de la membrana. La detección del segundo agente de unión unido puede llevarse a cabo después como se describió arriba. En el formato de tira de prueba, un extremo de la membrana a la cual
15 se une el agente de unión se sumergirá en una solución que contenga la muestra. La muestra migra a lo largo de la membrana a través de una región que contiene segundo agente de unión y al área de agente de unión inmovilizado. La concentración del segundo agente de unión en el área de
20 anticuerpo inmovilizado indica la presencia de un cáncer. La generación de un patrón, tal como una línea, en el sitio de unión, que puede verse visualmente, será indicadora de una prueba positiva. La ausencia de este patrón indica un resultado negativo. En general, la cantidad de agente de
25 unión inmovilizado sobre la membrana se selecciona para

generar un patrón visualmente discernible cuando la muestra biológica contenga un nivel de polipéptido que sería insuficiente para generar una señal positiva en el ensayo de emparejado de dos anticuerpos, en el formato descrito arriba.

5 Los agentes de unión preferidos para usarse en el presente ensayo de diagnóstico son los anticuerpos actualmente descritos, fragmentos de unión a antígeno de los mismos y cualquier agente de unión relacionado con CDMAB como el descrito en la presente. La cantidad de anticuerpo
10 inmovilizado sobre la membrana será cualquier cantidad efectiva para producir el ensayo de diagnóstico, y cualquier escala de aproximadamente 25 nanogramos a alrededor de 1 microgramo. Típicamente estas pruebas pueden llevarse a cabo con una cantidad muy pequeña de muestra biológica.

15 Además, el CDMAB de la presente invención puede usarse en el laboratorio para investigación gracias a su capacidad para identificar su antígeno objetivo.

Para que la invención descrita en la presente pueda entenderse más completamente, se muestra la siguiente
20 descripción.

La presente invención proporciona CDMAB (es decir, IDAC 141205-05 CDMAB, un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05, un anticuerpo
25 híbrido del anticuerpo monoclonal aislado producido por el

hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05, fragmentos de unión a antígeno o ligandos de anticuerpo de los mismos) que reconocen específicamente y se unen al antígeno IDAC 141205-05.

- 5 El CDMAB del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05 puede estar en cualquier forma siempre y cuando tenga una región de unión a antígeno que inhiba competitivamente la unión inmuno-específica del anticuerpo
- 10 monoclonal aislado producido por el hibridoma IDAC 141205-05 a su antígeno objetivo. De esta manera, cualquier proteína recombinante (por ejemplo, proteínas de fusión en las que el anticuerpo se combine con una segunda proteína tal como una linfocina o un factor de crecimiento inhibidor de tumor) que
- 15 tenga la misma especificidad de unión que el anticuerpo IDAC 141205-05 está dentro del alcance de esta invención.

En una modalidad de la invención, el CDMAB es el anticuerpo IDAC 141205-05.

- En otras modalidades, el CDMAB es un fragmento de
- 20 unión a antígeno que puede ser una molécula Fv (tal como una molécula Fv de cadena individual), una molécula Fab, una molécula Fab', una molécula F(ab')₂, una proteína de fusión, un anticuerpo biespecífico, un heteroanticuerpo o cualquier molécula recombinante que tenga la región de unión a antígeno
- 25 del anticuerpo IDAC 141205-05. El CDMAB de la invención está

dirigido al epítipo al cual se dirige el anticuerpo monoclonal IDAC 141205-05.

El CDMAB de la invención puede modificarse, es decir, mediante modificaciones de aminoácido dentro de la molécula, para producir así moléculas derivadas. También puede ser posible la modificación química. La modificación por mutación directa, métodos de maduración por afinidad, despliegue de fagos o desplazamiento de cadena también puede ser posible.

La afinidad y especificidad pueden modificarse o mejorarse al mutar residuos de CDR y/o de fenilalanina triptófano (FW) y tamizando para los sitios de unión a antígeno que tengan las características deseadas (por ejemplo, Yang et al., J. Mol. Biol., (1995) 254392-403). Una forma es la de aleatorizar residuos o combinaciones de residuos individuales de tal manera que en una población de sitios de unión a antígeno de otra manera idénticos, subconjuntos de dos a veinte aminoácidos se encuentren en posiciones particulares. Como alternativa, las mutaciones pueden ser inducidas sobre una gama de residuos mediante métodos de PCR propensos a error (por ejemplo, Hawkins et al., J. Mol. Biol. (1992) 226 889-96). En otro ejemplo, vectores de despliegue de fagos que contengan genes de la región variable de la cadena pesada y ligera pueden propagarse en cepas mutantes de *E. coli* (por ejemplo, Low et al, J Mol. Biol., (1996) 250:359-68). Estos

2/2

Organizacion y
Digitalizacion CSA Ltda

PATENTE

DE

INVENCION

09-135218

2/2
185218

métodos de mutagénesis son ilustrativos de los muchos métodos conocidos por alguien de capacidad en la técnica.

Otra manera de incrementar la afinidad de los anticuerpos de la presente invención es la de llevar a cabo desplazamiento de cadena, en donde las cadenas pesada o ligera son apareadas aleatoriamente con otras cadenas pesadas o ligeras para preparar un anticuerpo con afinidad más alta. Las diferentes CDRs de los anticuerpos también pueden ser agrupadas con las CDRs correspondientes en otros anticuerpos.

Las moléculas derivadas pueden conservar la propiedad funcional del polipéptido, en particular, la molécula que tenga estas sustituciones permitirá aún la unión del polipéptido al antígeno IDAC 141205-05 o porciones del mismo.

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

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

Estos cambios incluyen sustituir cualquiera de isoleucina (I), valina (V) y leucina (L) por cualquiera otros

de estos aminoácidos hidrófobos; ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E) y viceversa; glutamina (Q) para asparagina (N) y viceversa y serina (S) por treonina (T) y viceversa. Otras sustituciones también pueden considerarse conservadoras, dependiendo del ambiente del aminoácido particular y su papel en la estructura tridimensional de la proteína. Por ejemplo, glicina (G) y alanina (A) frecuentemente pueden ser intercambiables, al igual que alanina y valina (V). Metionina (M), la cual es relativamente hidrófoba, frecuentemente puede intercambiarse con leucina e isoleucina, y algunas veces con valina. Lisina (K) y arginina (R) frecuentemente son intercambiables en ubicaciones en las cuales la característica significativa del residuo de aminoácido es su carga y los pKs diferentes de estos dos residuos de aminoácido no son significativos. Otros cambios más pueden considerarse "conservadores" en ambientes particulares.

Ejemplo 1

Experimento de tumor in vivo con células de cáncer de seno

MDA-MB-231 humano

AR47A6.4.2 había demostrado previamente (como se describe en S.N. 11/709,676) eficacia en un modelo de xenoinjerto de cáncer de seno humano MCF-7. Para extender este descubrimiento AR47A6.4.2 se probó en un modelo de xenoinjerto de cáncer de seno humano MDA-MB-231 que difiere del modelo MCF-7 y su Her2/neu negativo, receptor negativo de

estrógeno y progesterona. Con referencia a las figuras 1, 2 y 3, ratones SCID hembra de 8 a 10 semanas de edad fueron implantados con 5 millones de células de cáncer de seno humano (MDA-MB-231) en 100 microlitros de solución de PBS inyectados subcutáneamente en el flanco derecho de cada ratón. Los ratones fueron divididos aleatoriamente en dos grupos de tratamiento de 10. Un día después del implante, 20 mg/kg de anticuerpo de prueba AR47A6.4.2 o control de regulador de pH se administraron intraperitonealmente a cada cohorte en un volumen de 300 microlitros después de dilución a partir de la concentración de abastecimiento con un diluyente que contenía 2.7 mM de KCl, 1 mM de KH_2PO_4 , 137 mM de NaCl y 20 mM de Na_2HPO_4 . Las muestras de anticuerpo y control fueron después administradas una vez por semana durante las primeras dos semanas y dos veces a la semana durante otras 3 semanas. Se midió el crecimiento del tumor una vez a la semana con calibres. El tratamiento se completó después de 8 dosis de anticuerpo. Se registraron los pesos corporales de los animales al mismo tiempo que la medición del tumor. Todos los animales fueron eutanizados de acuerdo con los lineamientos de CCAC al final del estudio una vez que habían alcanzado el criterio.

AR47A6.4.2 inhibió significativamente el crecimiento de tumor en el modelo profiláctico *in vivo* MDA-MB-231 de cáncer de seno humano. El tratamiento con el anticuerpo ARIUS

AR47A6.4.2 redujo el crecimiento de tumores MDA-MB-231 en 91.9 por ciento ($p < 0.00001$, prueba t), en comparación con el grupo tratado con regulador de pH, según se determinó el día 55, 5 días después de la última dosis del anticuerpo (figura 1).

5 Todos los ratones en el grupo de control fueron eliminados del estudio, debido a que alcanzaron el criterio, en el día 108, 58 días después de la última dosis de anticuerpo. Sin embargo, 90 por ciento de los ratones en el grupo tratado con AR47A6.4.2 aún estaban vivos en ese momento (figura 2).

10 No hubo señales clínicas obvias de toxicidad a lo largo del estudio. El peso corporal medido a intervalos semanales fue un sustituto para bienestar e incapacidad de desarrollo. El peso corporal medio se incrementó en todos los grupos durante la duración del estudio (figura 3). La ganancia de peso media entre el día 0 y día 55 fue de 1.3 g (6.9 por ciento) en el grupo de control y 1.8 g (9.3 por ciento) en el grupo tratado con AR47A6.4.2. No hubo diferencias significativas entre los grupos durante el periodo de tratamiento. En resumen, AR47A6.4.2 fue bien tolerado e inhibió significativamente el crecimiento del tumor en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama humano.

Ejemplo 2

Experimento de tumor in vivo con células de cáncer pancreático

PL45 humanas

25 AR47A6.4.2 había demostrado previamente (según se

describe en S.N. 11/709,676) eficacia en un modelo preventivo de xenoinjerto de cáncer pancreático humano PL45. Para determinar los niveles de dosis efectivos AR47A6.4.2 se probó en un modelo PL45 establecido a varias dosis. Con referencia a las figuras 4, 5, y 6, ratones SCID de hembra de 8 a 10 semanas de edad fueron implantados con 4 millones de células de cáncer pancreático humanas (PL45) en 100 microlitros de solución de PBS inyectada subcutáneamente en el pescuezo. Los ratones fueron divididos aleatoriamente en 5 grupos de tratamiento de 10 cuando el volumen de tumor de ratón promedio alcanzó aproximadamente 100 mm³. El día 32 después de la implantación, 20, 10, 2 ó 0.2 mg/kg de anticuerpo de prueba AR47A6.4.2 o regulador de pH de control se administraron intraperitonealmente a cada cohorte en un volumen de 300 microlitros después de la dilución a partir de la concentración de abastecimiento con un diluyente que contenía 2.7 mM de KCl, 1 mM de KH₂PO₄, 137 mM de NaCl y 20 mM de Na₂HPO₄. El anticuerpo y muestras de control fueron después administrados tres veces a la semana durante la duración del estudio. Se midió el crecimiento del tumor casi cada 4-7 días con calibres. El estudio se completó después de 10 dosis de anticuerpo. Se registraron los pesos corporales de los animales una vez por semana durante la duración del estudio. Todos los animales fueron sometidos a eutanasia de acuerdo con los lineamientos de la CCAC al final del estudio una vez que

habían alcanzado el criterio.

AR47A6.4.2 demostró inhibición de crecimiento de tumor dependiente de dosis en el modelo establecido *in vivo* PL45 de cáncer pancreático humano. Tratamiento con anticuerpo

5 ARIUS AR47A6.4.2 redujo el crecimiento de tumores PL45 en 48.9 por ciento ($p=0.0001$, prueba t), 34.6 por ciento ($p=0.0011$, prueba t), 17.4 por ciento ($p=0.1938$, prueba t) y 47 por ciento ($p=0.7065$, prueba t) a una dosis de 20, 10, 2 y 0.2 mg/kg respectivamente, en comparación con el grupo tratado con
10 regulador de pH, según se determinó el día 67, 14 días después de la última dosis de tratamiento (figura 4). Esto fue cuando casi todos los ratones en los grupos de control y tratados con anticuerpo aún estaban vivos. La supervivencia para todos los grupos se monitoreó hasta el día 88, 35 días después de la
15 última dosis de tratamiento. En este punto de tiempo, sólo 20 por ciento (2/10) de los ratones del grupo de control aún estaban vivos mientras que 60 por ciento (6/10), 40 por ciento (4/10) y 90 por ciento (9/10) de los ratones en el grupo tratado con AR47A6.4.2 de dosis de 20, 10 y 2 mg/kg
20 respectivamente aún estaban vivos (figura 5).

No hubo señales clínicas obvias de toxicidad a lo largo del estudio. El peso corporal medido a intervalos semanales fue un sustituto para bienestar e incapacidad de desarrollo. El peso corporal medio se incrementó en todos los
25 grupos durante la duración del estudio (figura 6). La

ganancia de peso media entre el día 32 y día 67 fue de 0.8 g (4.1 por ciento) en el grupo de control y 15 g (7.6 por ciento), 1.5 g (7.6 por ciento), 1.2 g (6.3 por ciento) o 1.9 g (9.5 por ciento) en el grupo tratado con AR47A6.4.2 a dosis de 20, 10, 2 y 0.2 mg/kg, respectivamente. No hubo diferencia significativa entre los grupos durante el periodo de tratamiento.

En resumen, AR47A6.4.2 fue bien tolerado e inhibió significativamente el crecimiento de tumor de una manera dependiente de dosis en este modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático humano establecido a 20 y 10 mg/kg. Los ratones en el grupo tratado con AR47A6.4.2 a dosis de más de 2 mg/kg también demostraron un beneficio de supervivencia significativo. En total, estos datos demuestran que AR47A6.4.2 es efectivo en el tratamiento de cáncer humano de una manera dependiente de dosis.

Ejemplo 3

Tinción de tejido multi-tumoral y normal humanos

Estudios IHC adicionales (los estudios previos se describen en S.N.11/709,676) se llevaron a cabo para caracterizar más la prevalencia del antígeno AR47A6.4.2 en cánceres humanos. Portaobjetos fueron transferidos de -80°C a -20°C. Después de una hora, los portaobjetos fueron fijados durante 10 minutos en acetona fría (-20°C) y luego se les dejó entrar a la temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron

enjuagados en solución salina de pH regulado con fosfato helada a 4°C (PBS) 3 veces durante 2 minutos seguidos cada uno por actividad peroxidasa endógena de bloqueo con lavado en 3 por ciento de peróxido de hidrógeno durante 10 minutos. Los

5 portaobjetos fueron después enjuagados en PBS 3 veces durante 5 minutos seguidos por incubación en solución de bloqueo Universal (Dako, Toronto, Ontario) durante 5 minutos a temperatura ambiente. AR47A6.4.2, actina de músculo anti-

10 humano (Clone HHF35, Dako, Toronto, Ontario), clon anti-citoqueratina 7 OV-TL 12/30 (Dako, Toronto, Ontario), clon anti-TROP-2 77220.11 (R&D System Inc, MN, E.U.A.) o anticuerpo de control de isotipo (dirigido a glucosa oxidasa de *Aspergillus niger*, una enzima que ni está presente ni es inducible en tejidos de mamífero; Dako, Toronto, Ontario)

15 fueron diluidos en regulador de pH de dilución de anticuerpo (Dako, Toronto, Ontario) hasta su concentración de trabajo de 5 microgramos/mL para cada anticuerpo, excepto para anti-actina la cual fue 0.5 microgramos/mL, anti-citoqueratina 7 estaba lista para usarse y anti-TROP-2 comercial fue 1

20 microgramo/mL, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados con PBS 3 veces durante 2 minutos cada una. Se detectó/visualizó la inmunorreactividad de los anticuerpos primarios con anticuerpos secundarios conjugados a HRP como se suministraron

25 (Dako Envision System, Toronto, Ontario) durante 30 minutos a

temperatura ambiente. Después de esta etapa los portaobjetos se lavaron con PBS 3 veces durante 5 minutos cada uno y una reacción de color se reveló al añadir DAB (tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobencidina, Dako, Toronto, Ontario) solución de

5 substrato de cromógeno para tinción con inmunoperoxidasa durante 10 minutos a temperatura ambiente. El lavar los portaobjetos en agua de la llave terminó la reacción cromogénica. Después de la contratinción con Hematoxilina de Meyer (Sigma Diagnostics, Oakville, ON), los portaobjetos

10 fueron deshidratados con etanoles graduados (75-100 por ciento) y aclarados con xileno. Usando medio de montaje (Dako Faramount, Toronto, Ontario) los portaobjetos fueron cubiertos. Para la disposición pancreática (Tri Star, Rockville, MD) se siguió el mismo protocolo excepto por las

15 siguientes modificaciones. Las secciones de tejido fueron inicialmente secadas al aire a temperatura ambiente durante 2 horas y secadas al aire de nuevo durante 30 minutos después de la fijación con acetona. El peróxido de hidrógeno endógeno se bloqueó usando 3 por ciento de peróxido de hidrógeno en

20 metanol durante 15 minutos; esta etapa se llevó a cabo después de la incubación de anticuerpo primario.

Los portaobjetos fueron examinados microscópicamente usando un Axiovert 200 (Ziess Canadá, Toronto, ON) y las imágenes digitales adquiridas y almacenadas usando Software de

25 Formación de Imágenes Northern Eclipse (Mississauga, ON). Los

resultados se leyeron, calificaron e interpretaron por un histopatólogo.

La figura 7 representa un resumen de los resultados de la tinción con AR47A6.4.2 de paneles de tumores humanos y tejidos normales correspondientes (11 cánceres de colon y 2 de colon normal, 8 cánceres ováricos y 2 de ovario normal, 12 cánceres de seno y 4 de seno normal, 15 cánceres pulmonares y 4 de pulmón normal, 14 cánceres de próstata y 4 de próstata normal y 14 cánceres pancreáticos y 5 de páncreas normal).

Estos tejidos fueron distribuidos sobre cuatro microdisposiciones de tejido (Tri Star, Rockville, MD). El anticuerpo mostró una unión moderada a fuerte a 6/11 (55 por ciento), 6/8 (75 por ciento), 11/12 (92 por ciento), 12/15 (80 por ciento), 14/14 (100 por ciento) y 3/14 (21 por ciento) de cánceres de colon, ovario, seno, pulmón, próstata y pancreático, respectivamente (figuras 8A-8F y 9A-9B). Además, una unión equívoca a débil se observó en 2/11 (18 por ciento), 1/12 (8 por ciento), 3/15 (20 por ciento) y 2/14 (14 por ciento) de cánceres de colon, seno, pulmón y pancreático, respectivamente. La unión fue específica para células tumorales en todos los tumores probados con sobre-expresión en tumores contra normal en algunos tejidos. Para los tejidos normales correspondientes el anticuerpo mostró unión a 0/2, 0/2, 4/4, 4/4, 4/4 y 5/5 de tejidos normales de colon, ovario, seno, pulmón, próstata y pancreático (figura 9). La unión fue

predominantemente a tejidos epiteliales de esos órganos. Anti-citoqueratina 7 o anti-actina, usados como control de anticuerpo positivo, mostraron la unión positiva esperada a tejidos epiteliales y tejidos musculares, respectivamente. El control negativo a isotipo de IgG mostró unión negativa a los tejidos probados.

Ejemplo 4

Blots perfiladores de proteomas fosfo-MAPK (proteína cinasa activada por mitógenos)

Para identificar moléculas de señalización intracelular afectadas por tratamiento con AR47A6.4.2, lisados de células tratadas con AR47A6.4.2 fueron tamizados usando una disposición de anticuerpos fosfo-MAPK humanos para perfilador de proteomas (ARY002, R&D Systems Inc, Minneapolis, MN).

Tratamiento y preparación de células

Trabajo previo (como el descrito en S.N. 11/709,676) demostró la eficacia *in vivo* de AR47A6.4.2 en un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático usando células BxPC-3 cultivadas en varios ratones inmunodeficientes combinados (SCID, por sus siglas en inglés). En consecuencia, el tamizado para la activación de las moléculas de señalización intracelular se llevó a cabo usando la línea de células BxPC-3. Las células BxPC-3 fueron cultivadas hasta casi confluencia, lavadas con solución salina de pH regulado con fosfato (PBS) y luego privadas de alimento en suero y medios

deficientes de complemento durante 4 horas a 37°C. Después de esto, AR47A6.4.2 (20 microgramos/mL) u 8A3B.6 (control de isotipo; IgG2a) (20 microgramos/mL) fue añadido a las células y se dejó unir durante 20 minutos a 4°C. Las células fueron
5 después estimuladas al añadir suero bovino fetal (FBS), L-glutamina y piruvato de sodio a las 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 fueron colocadas en una incubadora a 37°C y el lisado celular
10 se recogió 1 hora después de la estimulación. Las células fueron recogidas al lavar las células dos veces con PBS y cosechando el regulador de pH de lisis 6 (No. de Parte 895561: disposición de anticuerpos R&D Systems ARY002). Las células fueron resuspendidas por pipeteo, transferidas a un tubo
15 microcentrífugo de 1.5 mL y mezcladas mediante rotación a 4°C durante 30 minutos. Los lisados fueron después centrifugados a 14,000 xg durante cinco minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo de proteínas de ácido
20 bicinconínico (BCA, por sus siglas en inglés) (Pierce, Rockford, IL).

Disposición de anticuerpos fosfo-MAPK humanos

La disposición de anticuerpos fosfo-MAPK humanos se tamizó contra lisados de células BxPC-3 de acuerdo con el
25 protocolo descrito por el fabricante (Cuarta Revisión, Mayo

2006, disposición de anticuerpos R&D Systems ARY002). Brevemente, cada membrana del perfilador de fosfo-MAPK humano se preparó al incubar en 1.5 mL de regulador de pH de ensayo 1 (No. de Parte 895477: disposición de anticuerpos R&D Systems ARY002) durante 1 hora sobre un agitador de plataforma oscilatoria. Para cada tratamiento, 150 microgramos de proteína total fueron diluidos con regulador de pH de lisis 6 para dar un volumen final de 250 microlitros y se mezclaron con 125 mL de regulador de pH de disposición 1. Esta mezcla se añadió a las membranas del perfilador preparadas y se incubaron a 4°C durante la noche en un agitador de plataforma oscilatoria. Cada membrana fue después lavada 3 veces en 1X de regulador de pH de lavado (diluido en agua destilada purificada a partir de una solución de abastecimiento de 25X, (No. de Parte 895003: disposición de anticuerpos R&D Systems ARY002)) y se incubó durante 2 horas con 1.5 mL del coctel de anticuerpos de detección anti-fosfo-MAPK (que contenía anticuerpos fosfo-específicos biotinilados) (No. de Parte 893051: disposición de anticuerpos R&D Systems ARY002) preparado en 1X de regulador de pH de disposición 2/3 (regulador de pH de disposición 5X 2, No. de Parte 895478: disposición de anticuerpos R&D Systems ARY002; regulador de pH de disposición 3, No. de Parte 895008: disposición de anticuerpos R&D Systems ARY002). Las membranas fueron lavadas 3 veces en 1X de regulador de pH de lavado e incubadas durante

30 minutos con 1.5 mL de estreptavidina-HRP (No. de Parte 890803: disposición de anticuerpos R&D Systems ARY002) diluidas 1:2000 en 1X de regulador de pH de disposición 2/3. Las membranas se lavaron 3 veces en 1X de regulador de pH de lavado y se expusieron a reactivos de detección Western ECL plus (GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, NJ) para revelado. Las membranas se expusieron a película quimioluminiscente (Kodak, Rochester, NY) y se revelaron usando un procesador médico de rayos X. Los datos de la disposición fosfo-MAPK en las películas de rayos X reveladas fueron cuantificados al escanear la película en un escáner en modo de transmisión y analizar el archivo de imágenes de disposición usando software de análisis (Image J (Image J 1.37v, NIH). Para cada cinasa, la densidad de píxeles promedio para los puntos duplicados correspondientes se calculó y se restó de la señal de fondo usando la densidad de píxeles de un área transparente sobre la membrana. La densidad de píxeles normalizados promedio de muestras tratadas con AR47A6.4.2 se dividió entre la densidad de píxeles normalizados promedio de las muestras tratadas con 8A3B.6 para cada objetivo de fosfo-proteína correspondiente para obtener una relación de cambio relativo. La reducción porcentual de la señal fosfo-proteína se determinó al restar la relación de cambio relativo de 1 y multiplicando por 100.

El resultado de las membranas de la disposición

fosfo-MAPK incubadas con AR47A6.4.2 u 8A3B.6 se muestra en la figura 10. En comparación con 8A3B.6, AR47A6.4.2 suprimió la fosforilación de las cinasas reguladas por señal extracelular de p42/p44 MAPK (ERK) (ERK1 (32 por ciento) y ERK2 (20 por
5 ciento), Akt/proteína cinasa B (PKB) (Akt1/PKBalfa (15 por ciento), Akt2/PKBbeta (18 por ciento) y Akt3/PKBgamma (27 por ciento)) en células BxPC-3 estimuladas con suero y complementos. Estas cinasas están implicadas en las vías de señalización intracelular que pueden afectar la proliferación,
10 crecimiento y supervivencia de células. Que AR47A6.4.2 pueda reducir la fosforilación de estas cinasas después de su estimulación por suero y complementos sugiere que AR47A6.4.2 puede bloquear el crecimiento de supervivencia celular de células cancerosas a través de estas cinasas y sus vías de
15 señalización intracelular relacionadas.

Ejemplo 5

Disposición de anticuerpos de antiogénesis TranSignal™ de medios acondicionados

Para determinar si el tratamiento con AR47A6.4.2
20 puede afectar la secreción de factores angiogénicos, medios acondicionados a partir de células tratadas con AR47A6.4.2 fueron tamizados usando una disposición de anangiogénesis (MA6310, Panomics Inc., Redwood City, CA).

Tratamiento y preparación de células

25 Como se describe en S.N. 11/709,676, la eficacia in

vivo de AR47A6.4.2 se demostró en un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático usando células BxPC-3 cultivadas en varios ratones inmunodeficientes combinados (SCID). En consecuencia, el tamizado para secreción de factores angiogénicos se llevó a cabo usando la línea de células BxPC-3. Las células BxPC-3 se cultivaron hasta casi la confluencia, se lavaron con solución salina de pH regulado con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) y luego se reabastecieron con 2 mL de medio deficiente en suero. AR47A6.4.2 (20 microgramos/mL) u 8A3B.6 (control de isotipo; IgG2a) (20 microgramos/mL) se añadieron a las células y se dejaron unir durante 20 minutos a 4°C. Las células fueron puestas en una incubadora a 37°C durante 24 horas. Después de 24 horas, los medios acondicionados de cada cultivo se recogieron y centrifugaron a 1,200 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos para remover células o restos celulares.

Disposición de anticuerpos de angiogénesis

TranSignal™

Disposiciones de anticuerpos de angiogénesis TranSignal™ fueron tamizadas con medio acondicionado con células BxPC-3 de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante (editado 10/07/03, revisado 08/03/05; MA6310, Panomics Inc, Redwood City, CA). Brevemente, cada membrana de la disposición de anticuerpos de angiogénesis TranSignal™ se preparó al incubar en 3 mL de 1X regulador de pH de bloqueo

(MA6310, Panomics Inc, Redwood City, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente en un oscilador de plataforma oscilatoria. Las membranas se lavaron después dos veces con 4 mL de 1X de regulador de pH de lavado II (20X regulador de pH II diluido a 1X con agua destilada (dH₂O), MA6310, Panomics Inc., Redwood City, CA). Después de lavado, el medio acondicionado completo recogido (2 mL) se añadió a una membrana y se incubó durante la noche a 4°C en un agitador de plataforma oscilatoria. Las membranas fueron después lavadas 3X usando 4 mL de 1X regulador de pH de lavado I (20X de regulador de pH de lavado diluido a 1X en dH₂O, MA6310, Panomics Inc, Redwood City, CA). Esto fue seguido por tres lavados con 4 mL de 1X regulador de pH de lavado II (MA6310, Panomics Inc, Redwood City, CA). Las membranas se incubaron después durante 1 hora en 15 mL de mezcla anti-angiogénesis conjugada a biotina (MA6310, Panomics Inc, Redwood City, CA) sobre un agitador de plataforma oscilatoria, se lavaron 3X usando 4 mL de 1X regulador de pH de lavado I (MA6310, Panomics Inc, Redwood City, CA), seguidas por tres lavados con 4 mL de 1X regulador de pH de lavado II (MA6310, Panomics Inc, Redwood City, CA). Estreptavidina-HRP, diluida 1:1000 en 1X regulador de pH de lavado II, fue añadida a las membranas y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó de nuevo 3X usando 4 mL de 1X regulador de pH I (MA6310, Panomics Inc, Redwood City, CA) seguido por 3 lavados con 4 mL de 1X

regulador de pH de lavado II (MA6310, Panomics Inc, Redwood City, CA) y se revelaron usando el reactivo Hyperfilm™ ECL (RPN3114K, GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, NJ). Las membranas fueron expuestas a película quimioluminiscente (Kodak, Rochester, NY) y reveladas usando un procesador médico de rayos X. Los datos de disposición de angiogénesis en las películas de rayos X reveladas fueron cuantificados al escanear la película en un escáner en modo de transmisión y analizar el archivo de imagen de disposición usando software de análisis Image J (Image J 137v, NIH). Para cada factor secretado, la densidad de pixeles promedio para los puntos duplicados correspondientes se calculó y se restó de la señal de fondo usando la densidad de pixeles de un área transparente sobre la membrana. La densidad de pixeles normalizados promedio de las muestras tratadas con AR47A6.4.2 se dividió entre la densidad de pixeles normalizada promedio de las muestras tratadas con 8A3B.6 para cada objetivo correspondiente para obtener una relación de cambio relativo. La reducción porcentual de la señal se determinó al restar la relación de cambio relativo de 1 y multiplicar por 100.

Los resultados de las membranas de disposición de anticuerpos de angiogénesis TranSignal™ incubadas con AR47A6.4.2 u 8A3B.6 se muestran en la figura 11. En comparación con 8A3B6, AR47A6.4.2 suprime la secreción de los potentes factores angiogénicos factor de crecimiento

endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento placentario (PLGF). Esta observación sugiere que el tratamiento de la línea de células de cáncer pancreático BxPC-3 con AR47A6.4.2 puede resultar en la inhibición de crecimiento tumoral y supervivencia de las células cancerosas al reducir la secreción de factores por las células que promueven el crecimiento de vasos sanguíneos en tumores sólidos. Este descubrimiento demuestra un posible mecanismo de acción para AR47A6.4.2.

10

Ejemplo 6

Demostración de la actividad de Citotoxicidad Dependiente de

Complemento (CDC) *in vitro* del anticuerpo anti-TROP-2

AR47A6.4.2

La eficacia terapéutica de AR47A6.4.2 de murino se ha demostrado previamente en modelos de tumor de xenoinjerto de cáncer pancreático humano (como los descritos en S.N. 11/709,676 y en el ejemplo 2 arriba). Para elucidar su mecanismo de acción, AR47A6.4.2 se evaluó *in vitro* para actividad CDC en dos líneas de células de cáncer pancreático, PL45 y BxPC-3. Monocapas establecidas de células PL45 y BxPC-3, dos días después del paqueo, fueron tratadas con anticuerpo (2, 02 y 0.02 microgramos/mL) y se les dejó unir durante de una hora (37°C; 4 por ciento de CO₂). Complemento de conejo se añadió después para producir una concentración final de 10 por ciento (v/v) y las células se dejaron incubar durante tres

horas más a 37°C, 4 por ciento de CO₂. La actividad de CDC se evalúa al medir el lactato deshidrogenasa residual presente en células no comprometidas usando el kit Cytotox 96™ (Promega Corporation, Madison, WI, E.U.A.). Cada anticuerpo de prueba se evaluó por triplicado y los resultados fueron expresados como citotoxicidad porcentual, en comparación con complemento de conejo con los pocillos tratados sólo con complemento de conejo, usando la siguiente ecuación: Citotoxicidad porcentual = 100-[Anticuerpo de Prueba_(492nm)-Fondo_(492nm)]/Complemento Únicamente_(492nm)-Fondo_(492nm)]*100.

Los resultados de este experimento (figura 12) demuestran que el anticuerpo anti-TROP-2 AR47A6.4.2 fue capaz de reclutar complemento de conejo de una manera dependiente de dosis en ambas líneas de células objetivo de cáncer pancreático (PL45 y BxPC-3). La actividad CDC no se observó en estas líneas de células cuando se trataron con control igualado por isotipo a la concentración más alta (20 microgramos/mL). Estos datos demuestran que AR47A6.4.2 es capaz de el reclutamiento de complemento *in vitro* y puede ser uno de los mecanismos por medio de los cuales este anticuerpo está ejerciendo sus efectos *in vivo*.

Ejemplo 7

Mapeo de epítomos

Experimentos de mapeo de epítomos se llevaron a cabo para poder determinar las regiones de la molécula TROP-2 que

son reconocidas por AR47A6.4.2. Péptidos de 15 meros traslapantes fueron sintetizados con base en la secuencia de aminoácidos de TROP-2 usando química Fmoc estándar y desprotegidos usando ácido trifluórico con depuradores

- 5 Además, péptidos de hasta 30 meros de doble asa, triple asa y tipo lámina fueron sintetizados en andamiajes químicos para construir epítomos discontinuos de la molécula TROP-2, usando tecnología de Péptidos Enlazados Químicamente Sobre Andamiajes (CLIPS, por sus siglas en inglés). Los péptidos con asas
- 10 fueron sintetizados y contenían una dicisteína, la cual es ciclizada al tratar con alfa, alfa'-dibromoxileno y el tamaño del asa fue variado al introducir residuos de cisteína en separaciones variables. Si otras cisteínas aparte de las cisteínas recién introducidas estaban presentes, fueron
- 15 reemplazadas por una alanina. Las cadenas laterales de las varias cisteínas en los péptidos fueron acopladas a plantillas CLIPS al hacer reaccionar sobre tarjetas PEPSCAN de polipropileno en formato de tarjeta de crédito (455 formatos de péptido/tarjeta) con una solución 0.5 mM de plantilla CLIPS
- 20 tal como 1,3-bis(bromometil)benceno en bicarbonato de amonio (20 mM, pH 7.9)/acetonitrilo (1:1 (v/v)). Las tarjetas se agitaron suavemente en la solución durante 30 a 60 minutos mientras cubrían completamente en solución. Finalmente, las tarjetas fueron lavadas extensamente con exceso de H₂O y
- 25 sonificadas en regulador de pH de interrupción que contenía 1

por ciento de SDS/0.1 por ciento de beta-mercaptoetanol en PBS (pH 7.2) a 70°C durante 30 minutos, seguido por sonificación en H₂O durante otros 45 minutos. En total, 3,579 péptidos diferentes fueron sintetizados. La unión de anticuerpo a cada

5 péptido se probó en un ELISA a base de PEPSCAN. Las tarjetas de polipropileno en formato de tarjeta de crédito de 455 pocillos que contiene los péptidos enlazados covalentemente fueron incubadas con solución de anticuerpo primario que consistía en 10 microgramos/mL de AR47A6.4.2 diluido en

10 solución de bloqueo (5% de suero de suero de caballo (v/v), 5% de ovalbúmina (p/v) y 1% de Tween 80 en PBS) durante la noche. Después de lavar con PBS que contenía 1% de Tween 80, los péptidos fueron incubados con una dilución 1/1,000 de anticuerpo de peroxidasa de conejo anti-ratón en solución de

15 bloqueo (5 por ciento de suero de caballo (v/v), 5 por ciento de ovalbúmina (p/v) y Tween 80 en PBS) durante una hora a 25°C. Después de lavar con PBS que contenía 1 por ciento de Tween 80, el substrato de peroxidasa sulfonato de 2,2'-azino-

di-3-etilbenztiazolina (ABTS, por sus siglas en inglés) y 2

20 microlitos de 3 por ciento de H₂O₂ fueron añadidos. Después de una hora, se midió la revelación de color. El revelado de color se cuantificó en una escala logarítmica de 0 a 4,000 con un dispositivo acoplado a carga (CCD) y una cámara y un sistema de procesamiento de imágenes.

25 Los veinte péptidos (de 3,579) a los cuales

AR47A6.4.2 se unió más fuertemente se listan en la figura 13.

Dos puntos clave de aminoácidos fueron identificados al analizar la composición de los péptidos a los cuales se unió AR47A6.4.2. La secuencia de aminoácidos de puntos clave

5 LFRERYRLH (SEQ ID NO: 11) está presente en los péptidos número 1, 2, 7, 8, 12, 16, 17 y 18 y la secuencia de aminoácidos de puntos clave QVERTLIYY (SEQ ID NO 12) está presente en los péptidos número 11 y 20. Los péptidos 3-6, 10, 14, 15 y 19 muy probablemente representan un imitador de epítipo, ya que la

10 secuencia de estos péptidos está dentro de la porción intracelular de la molécula TROP-2. Sobre todo estos resultados indican que AR47A6.4.2 reconoce un epítipo discontinuo que consiste en las secuencias alrededor de LFRERYRLH (SEQ ID NO: 11) y QVERTLIYY (SEQ ID NO 12). La

15 posición de estas secuencias de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos de la molécula TROP-2 completa se presenta en la figura 14.

Ejemplo 8

Humanización de AR47A6.4.2

20 Se llevaron a cabo técnicas de ADN recombinante usando métodos bien conocidos en la técnica y, según fuera adecuado, instrucciones del proveedor para el uso de enzimas usadas en estos métodos. Los métodos de laboratorio detallados se describen también abajo.

25 ARNm fue extraído de las células AR47A6.4.2 de

hibridoma usando un kit de extracción de ARNm Poly A Tract System 1000 (Promega Corp., Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARNm fue transcrito inversamente como sigue: Para la cadena ligera kappa, 50
5 microlitros de ARNm fueron mezclados con 1.0 microlitro de 20 pmol/microlitro de cebador MulgGkV_L-3' OL040 (figura 15) y 5.5 microlitros de agua libre de nucleasa (Promega Corp., Madison, WI). Para la cadena ligera lambda, 5.0 microlitros de ARNm se mezclaron con 1.0 microlitros de 20 pmol/microlitro de cebador
10 MulgGλV_L-3' OL042 (figura 15) y 55 microlitros de agua libre de nucleasa (Promega Corp., Madison, WI). Para la cadena pesada gama, 5 microlitros de ARNm se mezclaron con 1.0 microlitro de 20 pmol/microlitro de cebador MulgGV_H-3' OL023 (figura 16) y 55 microlitros de agua libre de nucleasa
15 (Promega Corp., Madison, WI). Todas las tres mezclas de reacción se pusieron en el bloque precalentado del ciclizador térmico puesto a 70°C durante 5 minutos. Estos fueron helados sobre hielo durante 5 minutos antes de añadirse a cada regulador de pH de reacción ImPromII 5x de 4.0 microlitros
20 (Promega Corp., Madison, WI), inhibidor de ribonucleasa RNasina de 0.5 microlitros (Promega Corp., Madison, WI), 2.0 microlitros de MgCl₂ 25 mM (Promega Corp., Madison, WI), 10 microlitro de mezcla de dNTP 10 mM (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) y 1.0 microlitro de transcriptasa inversa ImProm II
25 (Promega Corp., Madison, WI). Las mezclas de reacción se

incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos antes de ser transferidas a un bloque de PCR precalentado puesto a 42°C durante 1 hora. Después de este tiempo la transcriptasa inversa fue inactivada con calor al incubar a 70°C en un
 5 bloque de PCR durante 15 minutos.

Las secuencias de la cadena pesada y ligera fueron amplificadas a partir de ADNc como sigue: una mezcla maestra de PCR se preparó al añadir 37.5 microlitros de regulador de pH de PCR 10x Hi-Fi Expand: (Roche, Mannheim, Alemania), 7.5
 10 microlitros de mezcla de dNTP 10 mM (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) y 375 microlitros de ADN polimerasa Hi-Fi Expand (Roche, Mannheim, Alemania) hasta 273.75 microlitros de agua libre de nucleasa. Esta mezcla maestra se colocó en alícuotas de 21.5 microlitros en 15 tubos de reacción de PCR de paredes
 15 delgadas sobre hielo. En seis de estos tubos se añadieron 25 microlitros de la mezcla de reacción de transcripción inversa Mulg VH-3' y 1.0 microlitro de fondos de cebador 5' de la cadena pesada HA a HF (véase figura 16 para las secuencias de cebadores y constituyentes del fondo de cebadores). A otros
 20 siete tubos se le añadieron 2.5 microlitros de la reacción de transcripción inversa MulgKVL-3' y 1.0 microlitro de los fondos de cebador de la cadena 5' ligera LA a LG (figura 15). En el tubo final se añadieron 2.5 microlitros de reacción de transcripción inversa MulgKVL-3' y 1.0 microlitro de cebador
 25 de cadena ligera lambda MulgλVL5'-LI. Las reacciones se

pusieron en el bloque del ciclizador térmico y se calentaron a 95°C durante 2 minutos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo durante 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 1
5 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 easy pGEM-T easy Vector System I (Promega Corp.,
10 Madison, WI) y se secuenciaron. Las secuencias 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 fueron amplificados por PCR usando los
15 cebadores OL334 y OL335 (figura 19); estos fueron designados en orden para manipularse en un sitio de enzima de restricción 5' MluI y a 3' HindIII usando ADN plasmídico de uno de los clones de ADNc como una plantilla. En un tubo de PCR de 05 mL se añadieron 5 microlitros de regulador de pH de PCR Hi-Fi
20 Expand 10x (Roche, Mannheim, Alemania), 1.0 microlitro de la mezcla de dNTP 10 mM (Invitrogen, Paisley, Reino Unido), 0.5 microlitros de cebador OL330, 0.5 microlitros de cebador OL331, 1.0 microlitros de ADN de plantilla y 0.5 microlitros de ADN polimerasa Hi-Fi Expand (Roche, Mannheim, Alemania) a
25 41.5 microlitros de agua libre de nucleasa.

Las regiones VL fueron amplificadas en un método similar usando los oligonucleótidos OL336 y OL337 (figura 20) para manipular en sitios de enzima de restricción BssHII y BamHI. Las reacciones fueron puestas en el bloque del ciclizador térmico y calentadas a 95°C durante 2 minutos. La reacción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo 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. Los productos de PCR de la región VH y VL fueron después clonados en los vectores pANT15 y pANT13 respectivamente (figura 21) en los sitios MIuI/Hindi y BssHII/BamHI respectivamente. Ambos pANT15 y pANT13 son plásmidos a base de pAT153 que contienen un casete de expresión de Ig humana. El casete de la cadena pesada en pANT15 consiste en un gen de la región constante de IgG1 genómico humano conducido por el promotor de hCMVie, con una región polyA de IgG humana hacia el extremo 3'. pANT15 contiene también un gen *dhfr* de hámster conducido por el promotor SV40 con una región polyA de SV40 hacia el extremo 3'. El casete de la cadena ligera de pANT13 está comprendido de la región constante kappa humana genómica conducida por el promotor hCMVie con la región polyA de la cadena ligera hacia el extremo 3'. Los sitios de clonación entre una secuencia líder de Ig humana y las regiones constantes permiten la

inserción de los genes de la región variable.

Células NS0 (ECACC 85110503, Porton, Reino Unido) fueron co-transfectadas con éstos dos plásmidos mediante electroporación y seleccionadas en DMEM (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) más 5 por ciento de FBS (Ultra low IgG Cat No. 16250-078, Invitrogen, Paisley, Reino Unido) más penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) más 100 nM de metotrexato (Sigma, Poole, Reino Unido). Las colonias resistentes a metotrexato fueron aisladas y el anticuerpo se purificó mediante cromatografía por afinidad a proteína A usando una columna HiTrap MabSelect SuRe de 1 mL (GE Healthcare, Amersham, Reino Unido) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

El anticuerpo quimérico se probó en un ensayo de competencia a base de ELISA usando anticuerpo de ratón AR47A6.4.2, biotinilado usando el kit de microbiotinilación de Biotintag (Sigma, Poole, Reino Unido). AR47A6.4.2 de ratón biotinilado se usó para unir células OVCAR-3 en presencia de concentraciones variables de anticuerpo competente. Las células OVCAR-3 fueron cultivadas hasta casi confluencia en placas de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejidos y de fondo plano y luego fijadas. El anticuerpo AR47A6.4.2 de ratón biotinilado se diluyó a 1 microgramo/mL y se mezcló con un volumen igual de anticuerpo competente a concentraciones que variaran de 0-5 microgramos/mL. 100 Microlitros de las

mezclas de anticuerpo fueron transferidos a los pocillos de la placa recubierta con OVCAR-3 y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa fue lavada y AR47A6.4.2 de ratón biotinilado unido fue detectado al añadir un conjugado de estreptavidina-HRP (Sigma, Poole, Reino Unido) (diluido a 1:500) y sustrato de OPD (Sigma, Poole, Reino Unido). El ensayo fue revelado en la oscuridad durante 5 minutos antes de ser detenido por la adición de HCl 3 M. La placa de ensayo se leyó después en un vector de placa MRX TCII (Dynex Technologies, Worthing, Reino Unido) a una absorbancia de 490 nm. El anticuerpo híbrido ((ch)AR47A6.4.2) mostró ser equivalente al anticuerpo AR47A6.4.2 de ratón en competencia con anticuerpo AR47A6.4.2 biotinilado para unión a células OVCAR-3.

Secuencias VH y VL humanizadas fueron designadas por comparación de las secuencias AR47A64.2 de ratón y secuencias VH y VL humanas homólogas. La secuencia de las variantes VH se dan en la figuras 22A-22C y de las variantes VL en las figuras 23A-23C. Genes de la región V humanizados fueron contruidos usando las plantillas VH y VL de AR47A6.4.2 de ratón para PCR usando oligonucleótidos de traslape largos para introducir aminoácidos de secuencias VH y VL humanas homólogas. Los oligonucleótidos usados para la generación de secuencias VH y VL humanizadas variantes se muestran en las figuras 19 y 20 respectivamente. Los genes variantes fueron

clonados directamente en los vectores de expresión pSVgpt y pSVhyg como se detalla en US2004260069 (Hellendoorn, Carr and Baker).

Todas las combinaciones de las cadenas pesada y
5 ligera humanizadas variantes (incluyendo las construcciones
quiméricas) fueron transfectadas transitoriamente en células
CHO-K1 (ECACC 85051005, Porton, Reino Unido) y los
sobrenadantes cosechados después de 48 horas. Los
sobrenadantes fueron cuantificados para expresión de
10 anticuerpos en un ELISA IgG Fc/Kappa usando IgG1/Kappa humana
purificada (Sigma, Poole, Reino Unido) como normas. Las
placas de 96 pocillos Immunosorb (Nalge nunc, Hereford, Reino
Unido) fueron revestidas con anticuerpo específico para IgG Fc
anti-humano de ratón (16260 Sigma, Poole, Reino Unido) diluido
15 a 1:1,500 en 1X PBS (pH 7.4) a 37°C durante 1 hora. Las
placas fueron lavadas tres veces en PBS + 0.05 por ciento de
Tween 20 antes de añadir muestras y parámetros, diluidas en 2
por ciento de BSA/PBS. Las placas se incubaron a temperatura
ambiente durante 1 hora antes de lavar tres veces en PBS/Tween
20 y añadir 100 microlitros/pocillo de anticuerpo de detección
conjugado a peroxidasa de cadena ligera kappa anti-humano de
cabra (A7164 Sigma, Poole, Reino Unido) diluido 1:1,000 en 2
por ciento de BSA/PBS. Las placas fueron incubadas a
temperatura ambiente durante 1 hora antes de lavar cinco veces
25 con PBS/Tween. El anticuerpo unido fue detectado usando

substrato OPD (Sigma, Poole, Reino Unido). El ensayo se reveló en la oscuridad durante 5 minutos antes de ser detenido por la adición de HCl 3 M. La placa de ensayo se leyó después en un lector de placa MRX TCII (Dynex Technologies, Worthing, Reino Unido) a 490 nm.

La unión de las variantes humanizadas se ensayó en el ELISA de unión por competencia descrito arriba. Se generó una curva estándar con concentraciones variables (156.25 ng/mL a 5 microgramos/mL) de anticuerpo híbrido purificado ((ch)AR47A6.4.2) que competía por la unión con AR47A6.4.2 de ratón a células OVCAR-3 fijas en una placa de microtitulación de 96 pocillos. La unión de AR47A6.4.2 de ratón a células OVCAR-3 fue detectada con conjugado de IgG anti-ratón de cabra:HRP (A2179 Sigma, Poole, Reino Unido) y reveladas usando substrato TMB (Sigma, Poole, Reino Unido). Usando la curva estándar quimérica, la inhibición porcentual esperada a las concentraciones probadas se calculó para cada variante y se comparó con la realmente observada. Los resultados fueron después normalizados al dividir la inhibición observada de la muestra de prueba entre la inhibición esperada para cada una de las diferentes combinaciones de cadena pesada/ligera. De esta manera una muestra con una relación observada/esperada = 1.0 tiene la misma afinidad de unión que el anticuerpo híbrido mientras que un valor > que 1.0 tiene unión reducida a TROP-2 y una muestra con una relación <1.0 tiene unión mejorada a

TROP-2. Los resultados se muestran en la figura 24.

Combinaciones de los genes VH y VL fueron clonadas en el vector doble pANT18 (el vector pANT18 se basa en el plásmido pANT15 descrito previamente, con el casete de la

5 cadena ligera de pANT13 clonado en los sitios de enzima de restricción SpeI/PciI) y transfectado en células CHO/dhfr (ECACC, 9406607) mediante electroporación y seleccionado en medios (DMEM de alta glucosa con L-glutamina y piruvato de sodio (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) más 5 por ciento de

10 FBS dializado (Cat No. 26400-044 Invitrogen, Paisley, Reino Unido), prolina (Sigma, Poole, Reino Unido) y penicilina/estreptomicina (Invitrogen, Paisley, Reino Unido) agotada en hipoxantina y timidina. Los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía por afinidad a proteína A

15 como arriba. Los anticuerpos purificados fueron esterilizados por filtro antes de almacenar (en PBS pH 7.4) a +4°C. Las concentraciones de los anticuerpos se calcularon mediante ELISA de captura IgG1 humana/kappa como arriba.

Cuatro de las muestras de anticuerpo purificadas

20 fueron probadas para unión a células OVCAR-3 que expresaban TROP-2 humano mediante un ELISA de competencia como el anterior. Concentraciones variables de cada anticuerpo (156 ng/mL a 5 microgramos/mL) fueron mezcladas con AR47A6.4.2 de ratón purificado y se añadieron a placas de microtitulación

25 recubiertas con células OVCAR-3 fijas. La unión de AR47A6.4.2

de ratón se detectó con conjugado de IgG (Fc):HRP anti-ratón de cabra como arriba. La absorbancia a 450 nm se midió en un lector de placa y esto se graficó contra la concentración de anticuerpo de prueba. La concentración de variantes seleccionadas requeridas para inhibir la unión de AR47A6.4.2 de ratón a células OVCAR-3 en un 50 por ciento (IC_{50}) se calculó y comparó con el anticuerpo híbrido.

La IC_{50} para los cuatro anticuerpos humanizados variantes y el anticuerpo híbrido son como sigue:

10	(ch)AR47A6.4.2 = 1.71 microgramos/mL
	(hu) AR47A6.4.2 variante HV2/KV3 = 2.24 microgramos/mL
	(hu) AR47A6.4.2 variante HV2/KV4 = 3.04 microgramos/mL
15	(hu) AR47A6.4.2 variante HV3/KV3 = 2.04 microgramos/mL
	(hu) AR47A6.4.2 variante HV3/KV4 = 1.02 microgramos/mL

Ejemplo 9

20 Determinación de la afinidad de unión de AR47A6.4.2 y (hu)

AR47A6.4.2 a rhTROP-2

La afinidad de unión de AR47A6.4.2, (h) AR47A6.4.2 variante HV2/KV3, (hu) AR47A6.4.2 variante HV2/KV4, (hu) AR47A6.4.2 variante HV3/KV3 y (hu) AR47A6.4.2 variante HV3/KV4
25 se comparó mediante la determinación de las constantes de

disociación (K_D) respectivas después de la unión a TROP-2 (rhTrop-2) humano recombinante.

Un anticuerpo monoclonal anti-poliHistidina (R&D Systems, Minneapolis, MN, E.U.A.) fue inmovilizado usando el
5 procedimiento de acoplamiento de amina estándar. La superficie de un chip sensor CM5 (GE Healthcare, Piscataway, NJ E.U.A. formalmente Biacore) fue activada por inyección de 104 microlitros de una mezcla de 1:1 de 0.4M EDC y 0.1M NHS (velocidad de flujo 10 microlitros/minuto). El anticuerpo
10 anti-polihiistidina fue inyectado a una concentración de 20 microgramos/mL (diluido en 10 mM de acetato de sodio, pH 5.5) para alcanzar aproximadamente 2,000 RU. Finalmente, 119 microlitros de etanolamina-HCL 1.0 M pH 8.5 fueron inyectados sobre la superficie para bloquear cualquier sitio activado no
15 ocupado de la superficie del chip sensor. rhTROP-2 marcado con gis (R&D Systems, Minneapolis, MN, E.U.A.) fue inyectado a 1 microgramo/mL y capturado por el marcador HIS sobre la superficie del chip, seguido por inyección de AR47A6.4.2, (hu) AR47A6.4.2 variante HV2/KV3, (hu)AR47A6.4.2 variante HV2/KV4,
20 (hu) AR47A6.4.2 variante HV3/KV3 o (hu) AR47A6.4.2 variante HV3/KV4. La regeneración de la superficie del chip sensor para inyecciones subsecuentes se logró mediante inyección de 10 mM de glicina-HCl, pH 20 durante 60 segundos a una velocidad de flujo de 50 microlitros/minuto. Los anticuerpos
25 fueron diluidos en regulador de pH de corrida (HBS-EP+, GE

Healthcare, Piscataway, NJ, E.U.A. formalmente Biacore) e
 inyectados en serie a concentraciones que variaban de 0.67 a
 333 nM, y la superficie se regeneró entre cada ciclo. Como un
 control, cada concentración de anticuerpo se inyectó también
 5 sobre una superficie de referencia, la cual había sido
 inmovilizada con anticuerpo anti-poliHistidina pero no tenía
 el rhTROP-2 capturado sobre la superficie. Usando Software de
 Evaluación Biacore T100 versión 1.1, se llevó a cabo el
 análisis cinético sobre los sensogramas obtenidos usando un
 10 modelo de interacción simple 1:1. Las constantes de velocidad
 de asociación y disociación medidas se usaron para calcular la
 KD de los anticuerpos. Los experimentos se llevaron a cabo
 usando un sistema Biacore T100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ,
 E.U.A. formalmente Biacore). Los resultados de estos
 15 experimentos produjeron valores de 3.03 nM para AR47A6.4.2 de
 murino mientras que los cuatro (hu) AR47A6.4.2 fueron de entre
 0.613 a 0.697 nM (figura 25), indicando que todos los
 anticuerpos están en la escala nanomolar a subnanomolar, y que
 las afinidades de los anticuerpos humanizados son más altas
 20 que aquellas de AR47A6.4.2 de murino progenitor. Las
 constantes de índice de asociación (Ka) y constantes de índice
 de disociación (Kd) también fueron tabuladas (figura 25).

Ejemplo 10

Aislamiento de aglutinantes competitivos

25 Dado un anticuerpo, alguien capacitado

ordinariamente en la técnica puede generar un CDMAB de inhibición competitiva, por ejemplo un anticuerpo competente, el cual es uno que reconoce el mismo epítipo (Belanger L et al., *Clinica Chimica Acta* 48:15-18 (1973)). Un método implica

5 inmunizar con un inmunógeno que exprese el antígeno reconocido por el anticuerpo. La muestra puede incluir pero no está limitada a tejidos, proteínas aisladas o líneas de células. Los hibridomas resultantes pueden ser tamizados usando un ensayo de competencia, el cual es uno que identifique

10 anticuerpos que inhiben la unión del anticuerpo de prueba, tal como ELISA, FACS o Western Blotting. Otro método podría hacer uso de bibliotecas de anticuerpos de despliegue de fagos y paneo para anticuerpos que reconozcan al menos un epítipo del antígeno (Rubinstein JL et al *Anal Biochem* 314:294-300

15 (2003)). En cualquier caso, se seleccionan anticuerpos con base en su capacidad para desplazar la unión del anticuerpo marcado original a por lo menos un epítipo de su antígeno objetivo. Estos anticuerpos podrían poseer por lo tanto la característica de reconocer al menos un epítipo del antígeno

20 como el anticuerpo original.

Ejemplo 11

Clonación de las regiones variables del anticuerpo monoclonal

AR47A6.4.2

Las secuencias de las regiones variables de las

25 cadenas pesada (V_H) y ligera (V_L) del anticuerpo monoclonal

producido por la línea de células de hibridoma AR47A6.4.2 se determinaron previamente (como se describe en S.N. 11/709,676). Para generar IgG quimérica y humanizada, los dominios de la cadena pesada variable y ligera variable pueden ser subclonados en un vector adecuado para expresión (como se describe en el ejemplo 8 arriba).

En otra modalidad, AR47A6.4.2 o su versión des-inmunizada, quimérica o humanizada se produce al expresar un ácido nucleico que codifique para el anticuerpo en un animal transgénico, de tal forma que el anticuerpo sea expresado y pueda ser recuperado. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser expresado de una manera específica de tejido que facilite la recuperación y purificación. En una de estas modalidades, un anticuerpo de la invención es expresado en las glándulas mamarias para secreción durante lactancia. Animales transgénicos incluyen pero no están limitados a ratones, cabras y conejos.

(i) Anticuerpo Monoclonal

ADN codificado para el anticuerpo monoclonal (como el descrito en S.N. 11/709,676) es fácilmente aislado y secuenciado usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos 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 puede ser puesto en vectores de expresión, los cuales son después transfectados en células hospederas tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) o

5 células de mieloma que de otra manera no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospederas recombinantes. El ADN también puede ser modificado, por ejemplo, al sustituir la

10 secuencia de codificación por los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias de murino homólogas. Los anticuerpos quiméricos o híbridos también pueden prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que incluyen agentes de entrelazamiento. Por ejemplo, se pueden

15 construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio disulfuro o al formar un enlace de tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato de metil-4-mercaptobutirimidato.

(ii) Anticuerpo Humanizado

20 Un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en éste desde una fuente no humana. Estos residuos de aminoácido no humanos comúnmente son conocidos como residuos de "importación", los cuales se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La

25 humanización se puede llevar a cabo usando el método de Winter

y colaboradores al sustituir CDRs de roedor o 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 (1988); revisado en Clark, Immunol, Today 21:397-402 (2000)).

Un anticuerpo humanizado puede prepararse mediante un proceso de análisis de las secuencias progenitoras y varios productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias progenitoras y humanizadas. Modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comercialmente y son familiares para los expertos en la técnica. Los programas de computadora están disponibles e ilustran y presentan visualmente estructuras de conformación tridimensional probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones visuales permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar residuos FR y combinarse a partir de la secuencia de consenso e importación de tal forma que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad incrementada por los antígenos objetivo. En general, los

residuos CDR son directa y muy sustancialmente implicados en influenciar la unión a antígeno.

(iii) Fragmentos de Anticuerpo

Se han desarrollado varias técnicas para la
5 producción de fragmentos de anticuerpo. Estos fragmentos
pueden producirse mediante células hospederas recombinantes
(revisado en Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11:548-557 (1999);
Little et al., Immunol Today 21:364-370 (2000)). Por ejemplo,
10 fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli*
y acoplarse químicamente para formar fragmentos 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 ensamble de la molécula F(ab')₂. De
15 acuerdo con otro enfoque, fragmentos Fv, Fab o F(ab')₂ pueden
también aislarse directamente del cultivo de células
hospederas recombinantes.

Ejemplo 12

**Una composición que comprende el anticuerpo de la presente
invención**

20 El anticuerpo de la presente invención se puede usar
como una composición para prevenir/tratar cáncer. La
composición para prevenir/tratar cáncer, la cual comprende el
anticuerpo de la presente invención, puede administrarse como
tal en forma de preparaciones líquidas, o composiciones
25 farmacéuticas de preparaciones adecuadas a humanos o mamíferos

(por ejemplo, ratas, conejos, borregos, cerdos, bovinos, felinos, caninos, simios, etc.) oral o parenteralmente (por ejemplo, intravascularmente, intraperitonealmente, subcutáneamente, etc.). El anticuerpo de la presente
5 invención puede administrarse por sí solo, o se puede administrar como una composición adecuada. La composición usada para la administración puede contener un vehículo farmacológicamente aceptable con el anticuerpo de la presente invención o su sal, un diluyente o excipiente. Esta
10 composición se proporciona en forma de preparaciones farmacéuticas adecuadas para administración oral o parenteral.

Ejemplos de la composición para administración parenteral son preparaciones inyectables, supositorios, etc. Las preparaciones inyectables pueden incluir formas de dosis
15 tales como inyecciones intravenosas, subcutáneas, intracutáneas e intramusculares, infusiones de goteo, inyecciones intra-articulares, etc. Estas preparaciones inyectables pueden prepararse mediante métodos conocidos públicamente. Por ejemplo, las preparaciones inyectables
20 pueden prepararse al disolver, suspender o emulsionar el anticuerpo de la presente invención o su sal en un medio acuoso estéril o un medio oleoso usado convencionalmente para inyecciones. Como el medio acuoso para inyecciones, están, por ejemplo, solución salina fisiológica, una solución
25 isotónica que contenga glucosa u otros agentes auxiliares,

etc., la cual se puede usar en combinación con un agente de solubilización adecuado tal como un alcohol (por ejemplo etanol), un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol), un agente tensioactivo no iónico (por ejemplo, polisorbato 80, HCO-50 (polioxietileno (50 moles) aducto de aceite de ricino hidrogenado)), etc. Como el método oleoso, se emplea, por ejemplo, aceite de ajonjolí, aceite de soya, etc., los cuales se pueden usar en combinación con un agente de solubilización tal como benzoato de bencilo, alcohol bencílico, etc. La inyección preparada de esta manera se rellena normalmente en una ampolleta adecuada. El supositorio usado para administración rectal puede prepararse al mezclar el anticuerpo de la presente invención o su sal con bases para supositorios convencionales. La composición para administración oral incluye preparaciones sólidas o líquidas, específicamente comprimidos (incluyendo grageas y comprimidos recubiertos con película), píldoras, gránulos, preparaciones en polvo, cápsulas (incluyendo cápsulas suaves), jarabe, emulsiones, suspensiones, etc. Esa composición se elabora mediante métodos conocidos públicamente y puede contener un vehículo, un diluyente o excipiente usado convencionalmente en el campo de preparaciones farmacéuticas. Ejemplos del vehículo excipiente para comprimidos son lactosa, almidón, sucrosa, estearato de magnesio, etc.

Adecuadamente, las composiciones para uso oral o

- parenteral descritas arriba se preparan en preparaciones farmacéuticas con una dosis única adecuada para ajustarse a una dosis de los ingredientes activos. Estas preparaciones de dosis única incluyen, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas,
- 5 inyecciones (ampolletas), supositorios, etc.. La cantidad de compuesto mencionado arriba contenida es generalmente de 5 a 500 mg por forma de unidad de dosis; se prefiere que el anticuerpo descrito arriba esté contenido en aproximadamente 5 a alrededor de 100 mg especialmente en forma de inyección, y en 10 a 250 mg para otras formas.
- 10 La dosis del agente profiláctico/terapéutico mencionado arriba o regulador que comprende un anticuerpo de la presente invención puede variar dependiendo del sujeto que será administrado, la enfermedad objetivo, condiciones, ruta de administración, etc. Por ejemplo, cuando se usa con el propósito de tratar/prevenir, por ejemplo, cáncer de seno
- 15 en un adulto, es adecuado administrar el anticuerpo de la presente invención intravenosamente en una dosis de alrededor de 0.01 a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal, de preferencia alrededor de 0.1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal y muy preferiblemente alrededor de 0.1 a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal,
- 20 aproximadamente 1 a 5 veces/día, de preferencia alrededor de 1 a 3 veces/día. En otra administración parenteral y oral, el agente puede administrarse en una dosis que corresponda a la dosis arriba. Cuando la afección sea especialmente severa, la dosis puede ser incrementada de acuerdo con la afección.
- 25 El anticuerpo de la presente invención puede administrarse

como tal o en forma de una composición adecuada. La composición usada para la administración puede contener un vehículo farmacológicamente aceptable con el anticuerpo mencionado arriba o sus sales, un diluyente o excipiente. Esta composición es provista en forma de preparaciones

5 farmacéuticas adecuadas para administración oral o parenteral (por ejemplo, inyección intravascular, inyección subcutánea, etc.). Cada composición descrita arriba puede contener además otros ingredientes activos. Además, el anticuerpo de la presente invención puede usarse en combinación con otros fármacos, por ejemplo, agentes alquilantes (por

10 ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, etc.), antagonistas metabólicos (por ejemplo, metotrexato, 5-fluorouracilo, etc.), antibióticos anti-tumorales (por ejemplo, mitomicina, adriamicina, etc.), agentes antitumorales derivados de plantas (por ejemplo, vincristina, vindesina, taxol, etc.), cisplatino, carboplatino, etopósido, irinotecano, etc. El

15 anticuerpo de la presente invención y los fármacos descritos arriba pueden administrarse simultáneamente o en momentos escalonados al paciente.

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

20 administración de otros anticuerpos o agentes quimioterapéuticos. Por ejemplo, un anticuerpo contra EGFR, tal como ERBITUX[®] (cetuximab), también se puede administrar, particularmente cuando se trata cáncer de colon. ERBITUX[®] también ha mostrado ser efectivo para el tratamiento de psoriasis. Otros anticuerpos para uso en combinación incluyen

25 Herceptin[®] (trastuzumab) particularmente cuando se trata cáncer de seno,

AVASTIN® 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 terapéuticos puede ocurrir simultáneamente, o por separado, mediante la misma o diferente ruta.

El agente quimioterapéutico/otros regímenes de anticuerpos utilizados incluyen cualquier régimen que se crea sea óptimamente adecuado para el tratamiento de la afección del paciente. Las malignidades diferentes pueden requerir uso de anticuerpos antitumor específicos y agentes quimioterapéuticos específicos, los cuales se determinarán sobre una base de paciente a paciente. En una modalidad preferida de la invención, se administra quimioterapia junto con, o, más preferiblemente, después de la terapia con anticuerpo. Sin embargo, se debe enfatizar que la presente invención no está limitada a ningún método o ruta de administración particular.

La preponderancia de evidencia muestra que AR47A6.4.2 media efectos anticáncer y prolonga la supervivencia a través de la ligación de epítomos presentes en TROP-2. Se ha mostrado previamente (como se describe en S.N. 11/709,676) que los anticuerpos AR47A6.4.2 pueden usarse para inmunoprecipitar el antígeno cognado de células de expresión tales como células MDA-MB-231. Además puede mostrarse que AR47A6.4.2, AR47A6.4.2 híbrido o variantes humanizadas, (hu)

AR47A6.4.2 pueden usarse en la detección de células y/o tejidos que expresen una porción antigénica TROP-2 que se une específicamente a los mismos, utilizando técnicas ilustradas por, pero no limitadas a FACS, ELISA de células o IHC.

- 5 Al igual que con el anticuerpo AR47A6.4.2, otros anticuerpos anti-TROP-2 podrían usarse para inmunoprecipitar y aislar otras formas del antígeno TROP-2, y el antígeno puede usarse también para inhibir la unión de esos anticuerpos a las células o tejidos que expresen el antígeno usando los mismos tipos de ensayos.

SEQ ID NOS:

	SEQ ID NO:	Secuencia
CDR1 pesada	1	NYGMN
CDR2 pesada	2	WINTKTGEPTYAEEFKG
CDR3 pesada	3	GGYGSSYWYFDV
CDR1 ligera	4	KASQDVSIAVA
CDR2 ligera	5	SASYRYT
CDR3 ligera	6	QQHYITPLT
HV2	7	Q I Q L V Q S G H E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E P T Y A E E F K G R F V F S L E T S A S T A Y L Q I S S L K A E D T A M Y F C G R G G Y G S S Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S

5

KV3	8	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I A V A W Y Q P G K A P K V L I Y S A S Y R Y T G V P D R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P E D I A V Y Y C Q Q H Y I T P L T F G G G T K V E I K
KV4	9	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I A V A W Y Q Q K P G K A P K V L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P E D I A V Y Y C Q Q H Y I T P L T F G G G T K V E I K
HV 3	10	Q I Q L V Q S G H E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E P T Y A E E F K G R F V F S L E T S A S T A Y L Q I S S L K A E D M A M Y F C G R G G Y G S S Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S

10

15

20

25

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta descripción son indicadoras de los niveles de aquellos capacitados en la técnica a la cual pertenece la invención. Todas las patentes y publicaciones se incorporan en la presente a manera de referencia al mismo grado que si cada publicación individual estuviera específica e individualmente

indicada como incorporada a manera de referencia.

Se debe entender que aunque cierta forma de la invención se ilustre, no se debe limitar a la forma o disposición específica o partes en la presente descritas y mostradas. Será aparente para aquellos expertos en la técnica que pueden hacerse varios cambios sin alejarse del alcance de la invención y que la invención no debe considerarse limitada a lo que se muestra y describe en la descripción. Alguien capacitado en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetivos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como aquellos inherentes a la misma. Cualquier oligonucleótido, péptido, polipéptido, compuesto biológicamente relacionado, método, procedimiento y técnica descrito en la presente es actualmente representativo de las modalidades preferidas, se intenta que sea ejemplar y no se intenta como limitación del alcance. Los cambios en los mismos y otros usos ocurrirán para aquellos expertos en la técnica que estén abarcados dentro del espíritu de la invención y sean definidos por el alcance de las reivindicaciones anexas. Aunque la invención ha sido descrita en relación con varias modalidades específicas preferidas, debe entenderse que la invención reclamada no debe limitarse indebidamente a estas modalidades específicas. De hecho, varias modificaciones a los modos descritos para llevar a cabo la invención que sean obvias para aquellos expertos en la técnica se intenta que estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método de reducción de un tumor pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano en un mamífero, 5 caracterizado porque el tumor pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano expresa al menos un epítipo de un antígeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma depositada en la IDAC con el número de registro 141205-05 o un 10 CDMAB del mismo, CDMAB con capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su antígeno objetivo, y que comprende administrar al mamífero el anticuerpo monoclonal o CDMAB del mismo en una cantidad efectiva para dar como resultado una reducción de la carga 15 tumoral de páncreas, seno, próstata, ovario o colon del mamífero.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es conjugado a una porción citotóxica.

20 3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la porción citotóxica es un isótopo radioactivo.

4. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB 25 del mismo activa complemento.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo media citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

5 6 El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05 o un fragmento de unión a antígeno
10 producido del anticuerpo humanizado.

7. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo híbrido del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de
15 registro 141205-05 o un fragmento de unión a antígeno producido del anticuerpo híbrido.

8. Un método de reducción de un tumor pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano susceptible a citotoxicidad celular inducida por anticuerpos en un mamífero,
20 en donde el tumor pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano expresa al menos un epítipo de un antígeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma depositada en la IDAC con el número de registro 141205-05 o un CDMAB del mismo, el CDMAB
25 se caracteriza por una capacidad para inhibir competitivamente

la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su antígeno objetivo, caracterizado porque comprende administrar al mamífero el anticuerpo monoclonal o el CDMAB del mismo en una cantidad efectiva para dar como resultado una reducción de la
5 carga tumoral pancreática, de seno, próstata, ovario o colon del mamífero.

9. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es conjugado a una porción citotóxica.

10 10. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque la porción citotóxica es un isótopo radioactivo.

11. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado o
15 CDMAB del mismo activa complemento.

12. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo media citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

20 13. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05 o un fragmento de unión a antígeno
25 producido del anticuerpo humanizado.

14. El método de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05 o un fragmento de unión a antígeno producido a partir del anticuerpo quimérico.

15. Un método de reducción de un tumor pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano en un mamífero, en donde el tumor pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano expresa al menos un epítipo de un antígeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05 o un CDMAB del mismo, CDMAB con capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su antígeno objetivo, caracterizado porque comprende administrar al mamífero el anticuerpo monoclonal o CDMAB del mismo en conjunto con al menos un agente quimioterapéutico en una cantidad efectiva para dar como resultado una reducción de la carga tumoral pancreática, de seno, próstata, ovario o colon del mamífero.

16. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado está conjugado a una porción citotóxica.

17. El método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la porción citotóxica es un isótopo

radioactivo.

18. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo activa complemento.

5 19. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo media citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

10 20. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05 o un fragmento de unión a antígeno producido del anticuerpo humanizado.

15 21. El método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05 o un fragmento de unión a antígeno
20 producido del anticuerpo quimérico.

22. Uso de anticuerpos monoclonales para la reducción de carga tumoral de seno, pancreática, ovárica, de próstata o colon en humanos, en donde el tumor de seno, pancreático, ovario, próstata o colon humano expresa al menos
25 un epítipo de un antígeno que se une específicamente al

- anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05 o un CDMAB del mismo, el CDMAB se caracteriza por una capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su antígeno objetivo, que comprende administrar al mamífero el anticuerpo monoclonal o CDMAB del mismo en una cantidad efectiva para dar como resultado una reducción de la carga tumoral de seno, pancreático, ovario, próstata o colon del mamífero.
- 10 23. El uso de conformidad con la reivindicación 22, en donde el anticuerpo monoclonal aislado es conjugado a una porción citotóxica.
24. El uso de conformidad con la reivindicación 23, en donde la porción citotóxica es un isótopo radioactivo.
- 15 25. El uso de conformidad con la reivindicación 22, en donde el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo activa complemento.
26. El uso de conformidad con la reivindicación 22, en donde el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo media citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.
- 20 27. El uso de conformidad con la reivindicación 22, en donde el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro
- 25 141205-05.

28. El uso de conformidad con la reivindicación 22, en donde el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro
5 141205-05.

29. Uso de anticuerpos monoclonales para la reducción de carga tumoral de seno, páncreas, ovario, próstata o colon en humanos, en donde el tumor de seno, páncreas, ovario, próstata o colon humano expresa al menos un epítipo de
10 un antígeno que se une específicamente al anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05 o un CDMAB del mismo, el CDMAB se caracteriza por una capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a
15 su antígeno objetivo, que comprende administrar al mamífero el anticuerpo monoclonal o CDMAB del mismo; en conjunto con al menos un agente quimioterapéutico en una cantidad efectiva para dar como resultado una reducción de la carga de tumor de seno, páncreas, ovario, próstata o colon humano del mamífero.

20 30. El método de conformidad con la reivindicación 29, en donde el anticuerpo monoclonal aislado es conjugado a una porción citotóxica.

31. El método de conformidad con la reivindicación 30, en donde la porción citotóxica es un isótopo radioactivo.

25 32. El método de conformidad con la reivindicación

29, en donde el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo activa complemento.

33. El método de conformidad con la reivindicación 29, en donde el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo media citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

34. El método de conformidad con la reivindicación 29, en donde el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05.

35. El método de conformidad con la reivindicación 29, en donde el anticuerpo monoclonal aislado es un anticuerpo híbrido del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05.

36. Un proceso para la reducción de un tumor de seno, páncreas, ovario, próstata o colon humano que expresa al menos un epítipo de antígeno TROP-2 humano al que se une específicamente el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR47A6.4.2 que tiene número de registro IDAC 141205-05, caracterizado porque comprende:

administrar a un individuo que sufra del tumor humano, al menos un anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo que se une al mismo epítipo o epítipos que aquellos a los que se une el anticuerpo monoclonal aislado producido por

la línea de células de hibridoma AR47A6.4.2 que tiene número de registro IDAC 141205-05;

5 en donde la unión del epítipo o epítapos da como resultado una reducción de la carga tumoral de seno, páncreas, ovario, próstata o colon.

37. Un proceso para la reducción de un tumor de seno, páncreas, ovario, próstata o colon en un humano que exprese al menos un epítipo de antígeno TROP-2 humano al que se une específicamente el anticuerpo monoclonal aislado
10 producido por la línea de células de hibridoma AR47A6.4.2 que tiene el número de registro IDAC 141205-05, caracterizado porque comprende:

administrar a un individuo que sufra del tumor humano, al menos un anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del
15 mismo, que se una al mismo epítipo o epítapos que aquellos a los que se une el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR47A6.4.2 que tiene el número de registro IDAC 141205-05 en conjunto con al menos un agente quimioterapéutico;

20 en donde la administración da como resultado una reducción de la carga tumoral.

38. Un ensayo de unión para determinar una presencia de células cancerosas en una muestra de tejido seleccionada de un tumor humano, a las que se une específicamente el
25 anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de

células de hibridoma AR47A6.4.2 que tiene el número de registro IDAC 141205-05, el anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05 o el
5 anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05, caracterizado porque comprende:

proporcionar una muestra de tejido del tumor humano;

proporcionar al menos uno del anticuerpo monoclonal
10 aislado, el anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico o CDMAB del mismo que reconozca el mismo epítipo o epítipos que aquellos reconocidos por el anticuerpo monoclonal aislado producido por una línea de células de hibridoma AR47A6.4.2 que tiene el número de registro IDAC 141205-05;

15 poner en contacto al menos uno de los anticuerpos proporcionados o CDMAB del mismo con la muestra de tejido, y determinar la unión del por lo menos un anticuerpo proporcionado o CDMAB del mismo con la muestra de tejido;

con lo cual se indica la presencia de las células
20 cancerosas en la muestra de tejido.

39. Un ensayo de unión para determinar la presencia de células que expresan TROP-2 que son reconocidas específicamente por el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR47A6.4.2 que tiene el
25 número de registro IDAC 141205-05, el anticuerpo humanizado

del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05 o el anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número
5 de registro 141205-05, caracterizado porque comprende:

proporcionar una muestra de células;

proporcionar el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR47A6.4.2 que tiene el número de registro IDAC 141205-05, el anticuerpo
10 humanizado, el anticuerpo quimérico o CDMAB del mismo;

poner en contacto el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de unión a antígeno con la muestra de células y

determinar la unión del anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo con la muestra de células;

15 con lo cual se determina la presencia de células que expresan un antígeno de TROP-2 al que se une específicamente el anticuerpo monoclonal aislado o el CDMA del mismo.

40. Un método para inducir citotoxicidad dependiente de complemento de células cancerosas que expresan al menos un
20 epítipo de TROP-2 sobre la superficie celular, el por lo menos un epítipo, cuando se le une el anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC como 141205-05 o un fragmento de unión a antígeno producido del anticuerpo monoclonal aislado da como resultado citotoxicidad celular,
25 caracterizado porque comprende:

proporcionar el anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC como 141205-05 o un fragmento de unión a antígeno producido del anticuerpo monoclonal aislado, y

5 poner en contacto las células cancerosas con el anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de unión a antígeno;

 con lo cual la citotoxicidad ocurre como resultado de la unión del anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento
10 de unión a antígeno con el por lo menos un epítipo de TROP-2.

 41. El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado se conjuga a una porción citotóxica.

 42. El método de conformidad con la reivindicación
15 41, caracterizado porque la porción citotóxica es un isótopo radioactivo.

 43. El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado activa complemento.

20 44. El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal aislado media citotoxicidad celular.

 45. El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal es un
25 anticuerpo humanizado del anticuerpo monoclonal aislado

producido por el hibridoma depositado en la IDAC como 141205-05 o un fragmento de unión a antígeno producido a partir del anticuerpo humanizado.

5 46. El método de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico del anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC como 141205-05 o un fragmento de unión a antígeno producido del anticuerpo quimérico.

10 47. Un método para inducir citotoxicidad dependiente de complemento de células cancerosas que expresan al menos un epítipo de TROP-2 sobre la superficie de la célula, el por lo menos un epítipo, cuando se le une el anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC como
15 141205-05 o un fragmento de unión a antígeno producido del anticuerpo monoclonal aislado da como resultado citotoxicidad celular, caracterizado porque comprende:

proporcionar un anticuerpo monoclonal aislado que inhibe competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal
20 aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC como 141205-05 o de un fragmento de unión a antígeno producido a partir del anticuerpo monoclonal aislado, y el cual cuando se le une el por lo menos un epítipo de TROP-2 da como resultado citotoxicidad celular; y

25 poner en contacto las células cancerosas con el

anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de unión a antígeno;

con lo cual ocurre citotoxicidad como resultado de la unión del anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de unión a antígeno con el por lo menos un epítopo de TROP-2.

48. Un anticuerpo monoclonal caracterizado porque se une específicamente al mismo epítopo o epítopos que el anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05.

49. Un anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo, caracterizado porque se une específicamente a TROP-2 humano, en el cual el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo reacciona con el mismo epítopo o epítopos de TROP-2 humano que el anticuerpo monoclonal aislado producido por una línea de células de hibridoma AR47A6.4.2 que tiene el número de registro IDAC 141205-05; el anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo se caracteriza por una capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal aislado a su antígeno TROP-2 humano objetivo.

50. Un anticuerpo monoclonal aislado o CDMAB del mismo que reconoce el mismo epítopo o epítopos que aquellos reconocidos por el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR47A6.4.2 que tiene el número de registro IDAC 141205-05, caracterizado porque presenta una capacidad para inhibir competitivamente la unión

del anticuerpo monoclonal aislado a su epítopo o epítopos objetivo.

51. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente al mismo epítopo o epítopos de TROP-2 humano que el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR47A6.4.2 que tiene el número de registro IDAC 141205-05, caracterizado porque comprende:

una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región de determinación de complementariedad de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de la región de determinación de complementariedad de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6;

o un fragmento de unión a TROP-2 humano del mismo.

52. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente al mismo epítopo o epítopos de TROP-2 humano que el anticuerpo monoclonal aislado producido por la línea de células de hibridoma AR47A6.4.2 que tiene el número de registro IDAC 141205-05, caracterizado porque comprende:

una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias aminoácidos de la región de determinación de complementariedad de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3; y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de región de

determinación de complementariedad de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6; y regiones estructurales de dominio variable de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo humano o estructura de consenso de anticuerpo humano;

5 o un fragmento de unión a TROP-2 humano del mismo.

53. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente a TROP-2 humano, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID No: 7; y
10 una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO: 8;

o un fragmento de unión a TROP-2 humano del mismo.

54. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente a TROP-2 humano, caracterizado porque el
15 anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 7; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera seleccionada de SEQ ID: 9;

o un fragmento de unión a TROP-2 humano del mismo.

55. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente a TROP-2 humano, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10, y
20 una secuencia de aminoácidos de la región variable de la
25 cadena ligera seleccionada de SEQ ID 8;

o un fragmento de unión a TROP-2 humano del mismo.

56. Un anticuerpo humanizado que se une específicamente a TROP-2 humano, caracterizado porque el anticuerpo monoclonal comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 10; y una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera seleccionada de SEQ ID NO: 9;

o un fragmento de unión a TROP-2 humano del mismo.

57. Una composición efectiva para tratar un tumor pancreático, de próstata, ovárico, de seno o colon humano, caracterizada porque comprende en combinación:

el anticuerpo o CDMAB de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 6, 7, 8, 17, 49, 50, 54, 55 ó 56;

un conjugado de anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo con un miembro seleccionado del grupo que consiste en porciones citotóxicas, enzimas, compuestos radioactivos, citocinas, interferones, porciones objetivo o reporteras y células hematógenas; y

una cantidad necesaria de un vehículo farmacológicamente aceptable;

en donde la composición es efectiva para tratar el tumor pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano.

58. Una composición efectiva para tratar un tumor pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano,

caracterizada porque comprende en combinación:

el anticuerpo o CDMAB de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 6, 7, 8, 17, 49, 50, 54, 55 ó 56;

5 y una cantidad necesaria de un vehículo farmacológicamente aceptable;

en donde la composición es efectiva para tratar el tumor pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano.

59. Una composición efectiva para tratar un tumor
10 pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano, caracterizada porque comprende en combinación:

un conjugado del anticuerpo, fragmento de unión a antígeno o CDMAB de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 6, 7, 17, 49, 50, 54, 55 ó 56, con
15 un miembro seleccionado del grupo que consiste en porciones citotóxicas, enzimas, compuestos radioactivos, citocinas, interferones, porciones objetivo o reporteras y células hematógenas; y

una cantidad necesaria de un vehículo
20 farmacológicamente aceptable;

en donde la composición es efectiva para tratar el tumor pancreático, de seno, próstata, ovario o colon humano.

60. Un kit de ensayo para detectar la presencia de un tumor canceroso humano, en donde el tumor canceroso humano
25 expresa al menos un epítipo de un antígeno que se une

específicamele al anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC como número de registro 141205-05 o un CDMAB del mismo, CDMAB con capacidad para inhibir competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal

5 aislado a su antígeno objetivo, el kit está caracterizado porque comprende el anticuerpo monoclonal aislado producido por el hibridoma depositado en la IDAC con el número de registro 141205-05 o un CDMAB del mismo, y medios para detectar si el anticuerpo monoclonal, o un CDMAB del mismo, se

10 une a un polipéptido cuya presencia, a un nivel límite particular, es diagnóstico de la presencia del tumor canceroso humano.

FIGURA 1

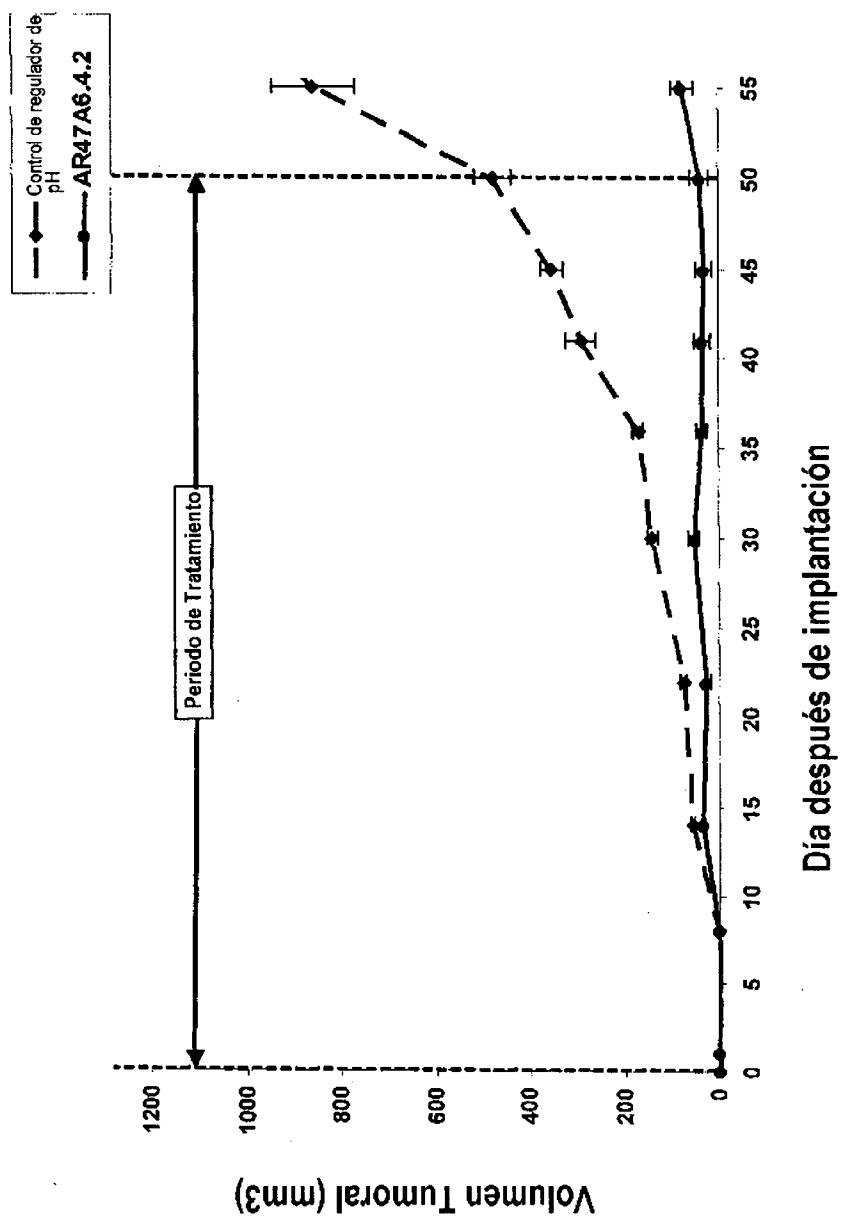


FIGURA 2

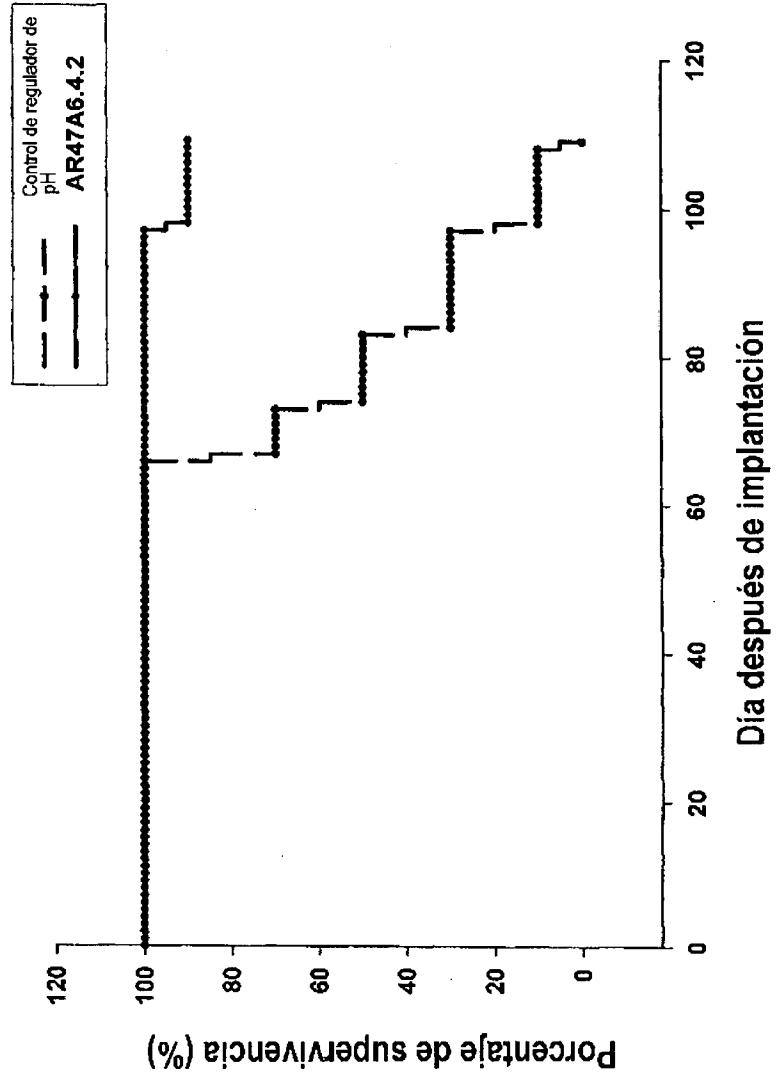


FIGURA 3

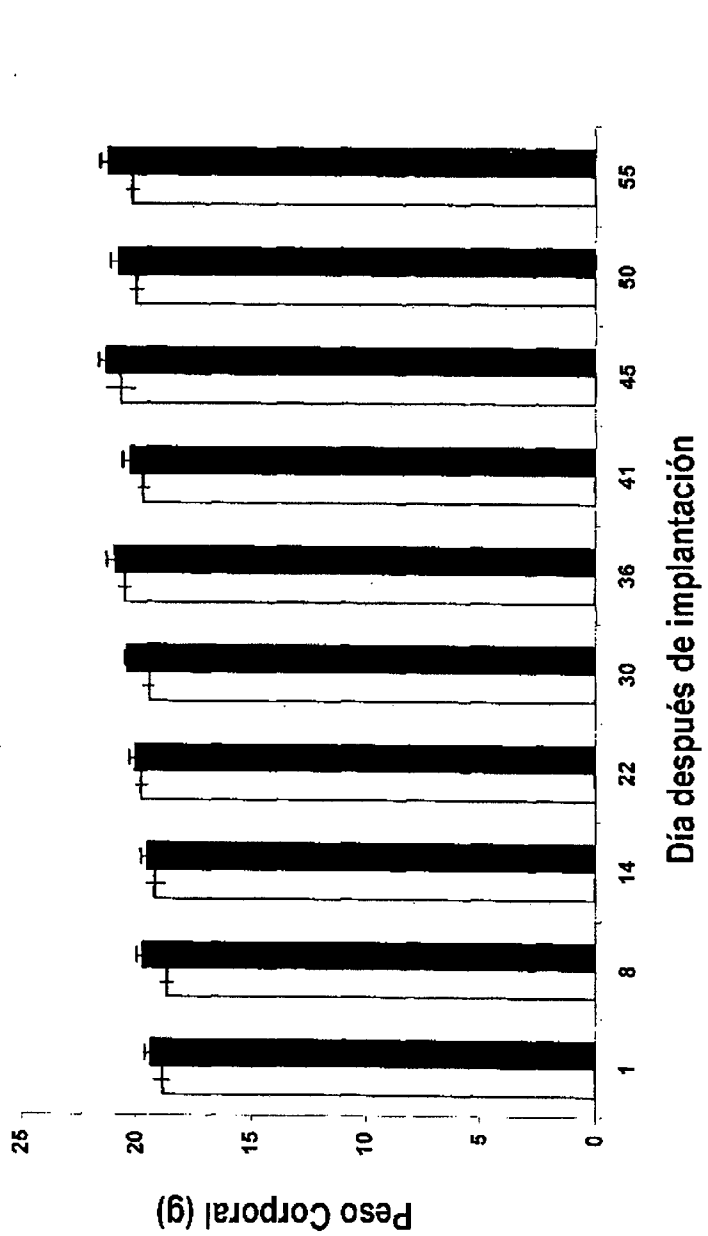


FIGURA 4

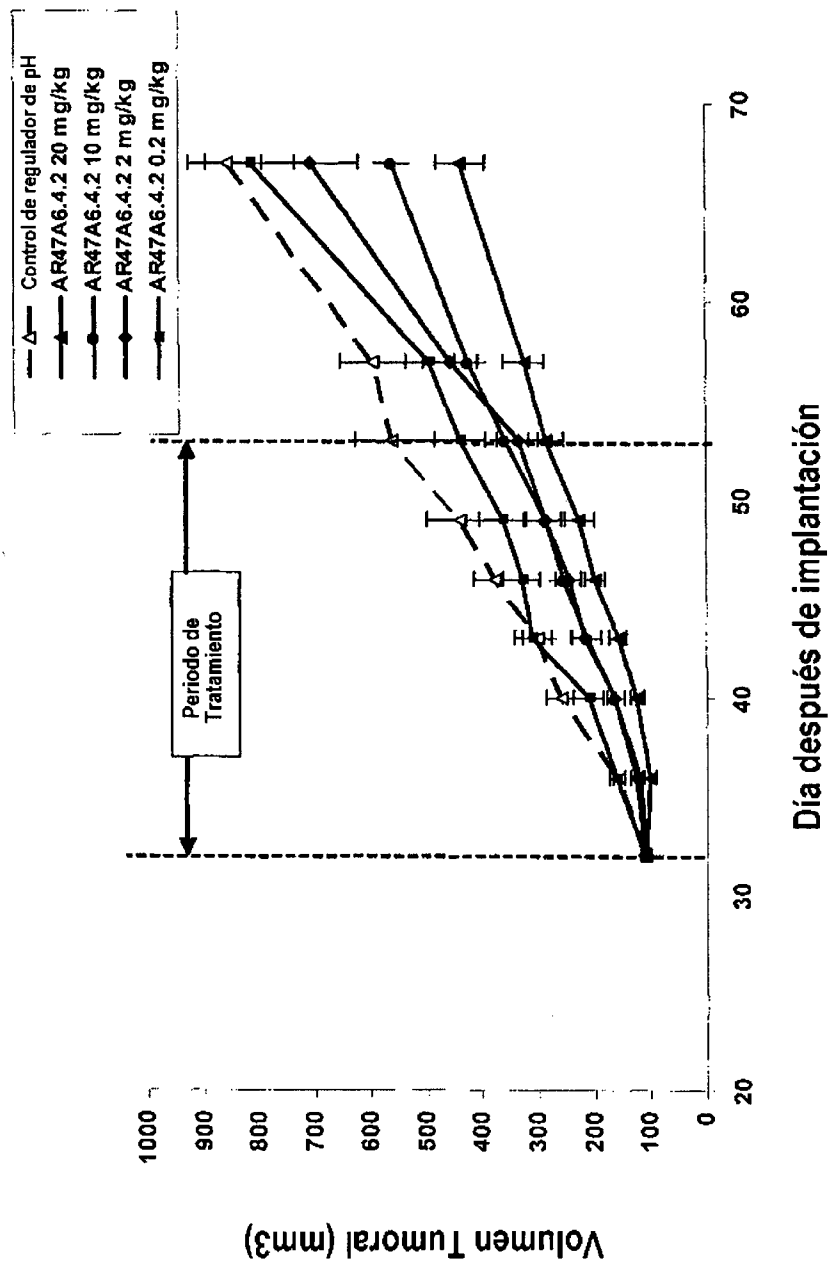


FIGURA 5

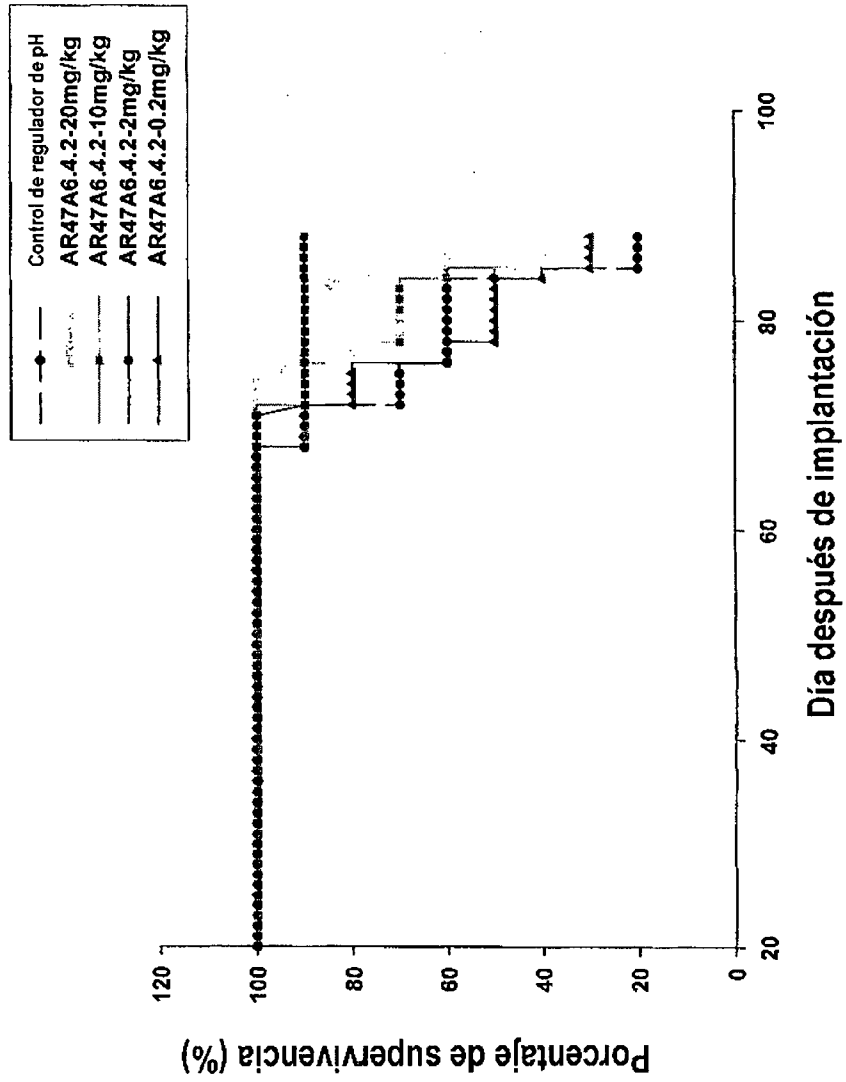


FIGURA 6

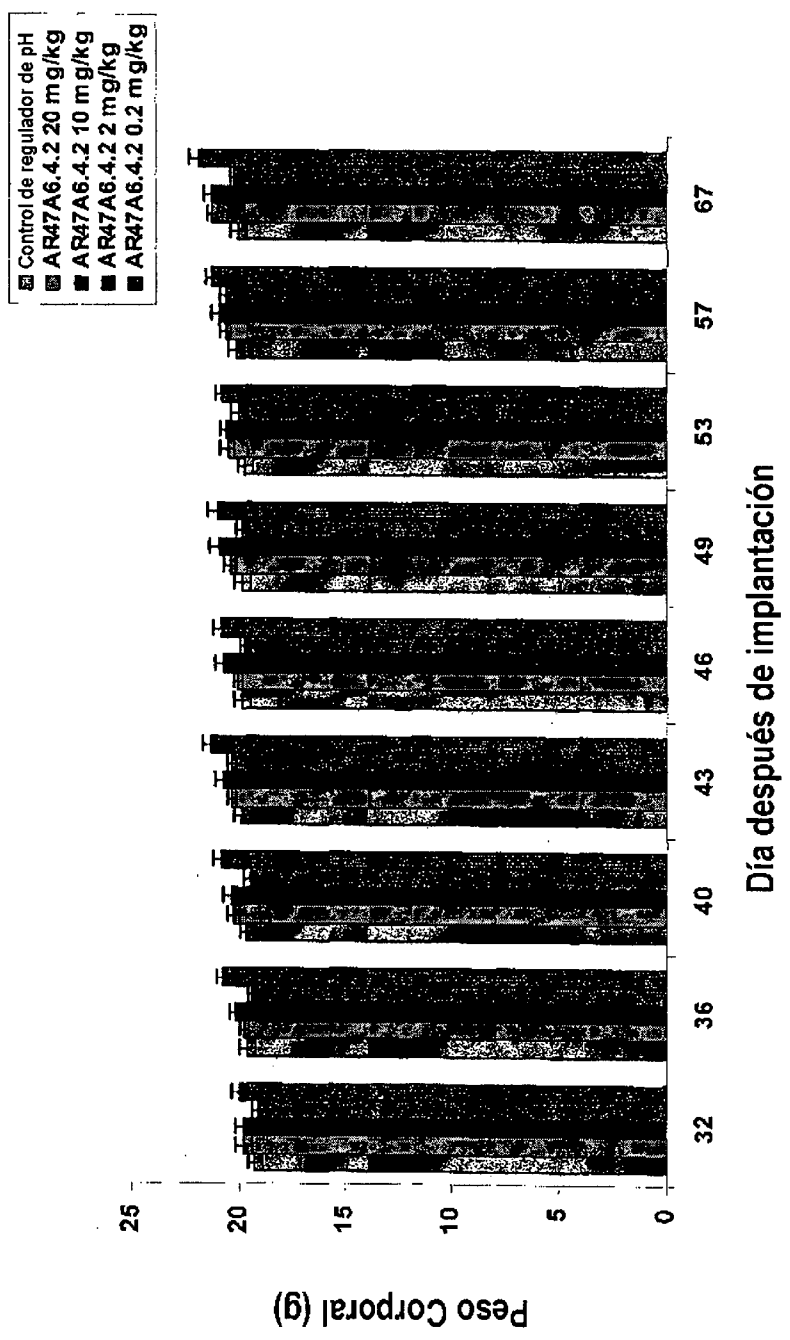


FIGURA 7

Tejido	Total	Resultado de IHC			
		-	Moderado-Fuerte (++, +++) Positivo	Débil (+/-, +) Positivo	Positivo Total
Cáncer de Colon	11	3	6/11 (55%)	2/11 (18%)	8/11 (73%)
Colon Normal	2	2	0	0	0
Cáncer Ovárico	8	2	6/8 (75%)	0	6/8 (75%)
Ovario Normal	2	2	0	0	0
Cáncer de Seno	12	0	11/12 (92%)	1/12 (8%)	12/12 (100%)
Senos Normal	4	0	4/4 (100%)	0	4/4 (100%)
Cáncer Pulmonar	15	0	12/15 (80%)	3/15 (20%)	15/15 (100%)
Pulmón Normal	4	0	3/4 (75%)	1/4 (25%)	4/4 (100%)
Cáncer Prostático	14	0	14/14 (100%)	0	14/14 (100%)
Próstata Normal	4	0	3/4 (75%)	1/4 (25%)	4/4 (100%)
Cáncer Pancreático	14	9	3/14 (21%)	2/14 (14%)	5/14 (36%)
Páncreas Normal	5	0	5/5 (100%)	0	5/5 (100%)

FIGURA 8

FIGURA 8A



FIGURA 8B

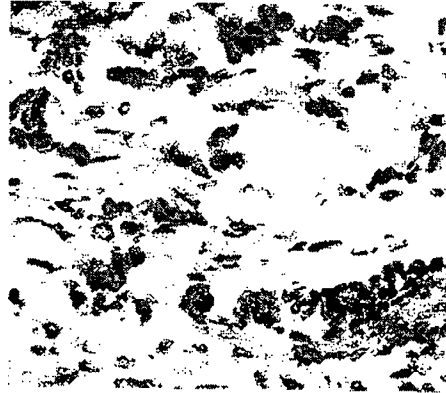


FIGURA 8C



FIGURA 8D

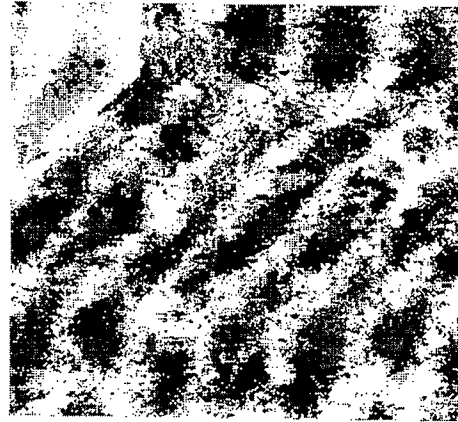


FIGURA 8E

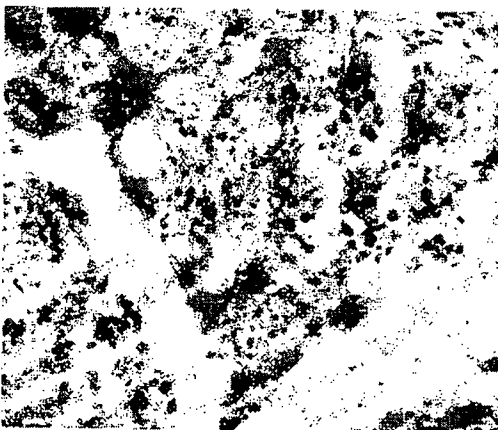


FIGURA 8F

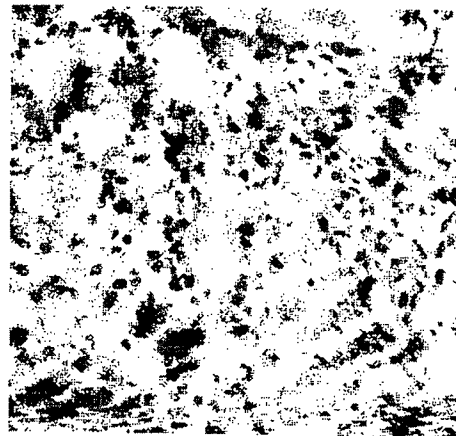


FIGURA 9A



FIGURA 9B



10/29

FIGURA 10

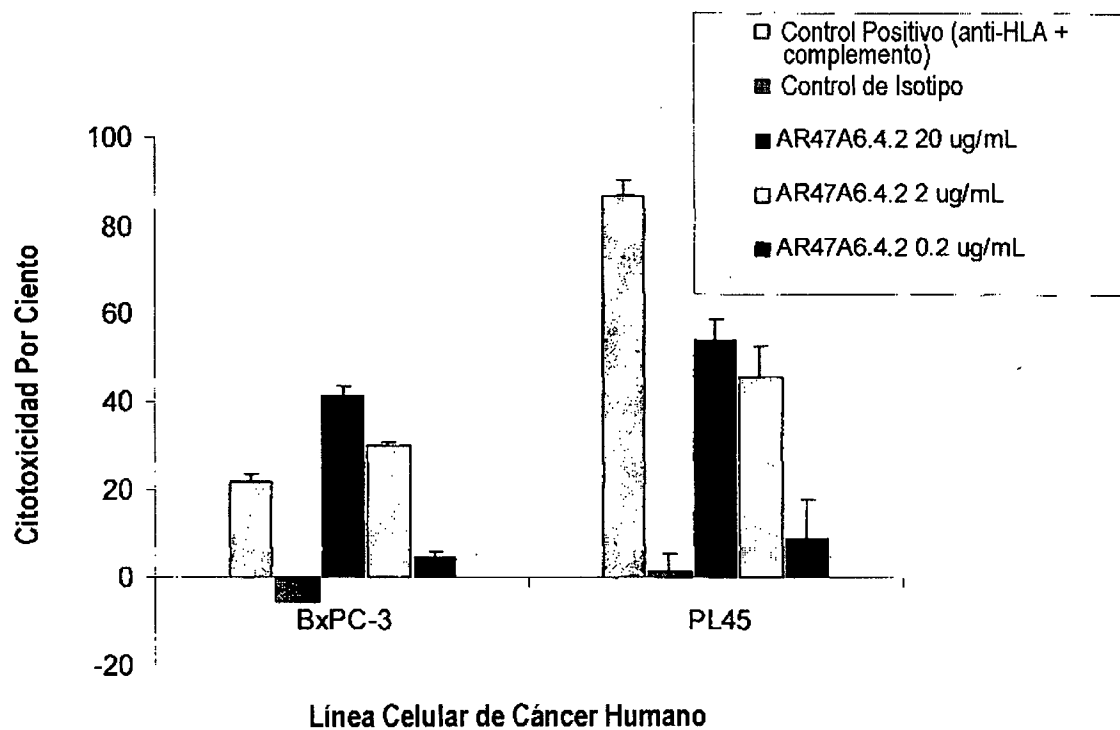
Proteína Fosforilada (Objetivo)	Supresión Por Ciento Con AR47A6.4.2
ERK1 (p44MAPK)	32
ERK2 (p42MAPK)	20
Akt1 (PKBalpha)	15
Akt2 (PKBbeta)	18
Akt3 (PKBgamma)	27

FIGURA 11

Factor Secretado	Supresión Por Ciento
VEGF	21
PLGF	77

12/29

FIGURA 12



200

FIGURA 13

Número	Péptido	Unión de AR47A6.4.2
1	RRLFRERYRLHPKF	518
2	RLFRERYRLHPKFV	387
3	GMAVLVITNRRKSG	349
4	MAVLVITNRRKSGK	335
5	LVAGMAVLVITNRR	317
6	AVLVITNRRKSGKY	308
7	AELRRLFRERYRLH	306
8	LFRERYRLHPKFVA	303
9	LFQGRGGLDLRVRG	302
10	VAGMAVLVITNRRK	296
11	LQVERTLIYYLDEI	293
12	ELRRLFRERYRLHP	291
13	LVRTHHILIDLRHR	291
14	AGMAVLVITNRRKS	285
15	LVITNRRKSGKYKK	283
16	DAELRRLFRERYRL	280
17	LRRLFRERYRLHPK	277
18	LDAELRRLFRERYR	276
19	VLVITNRRKSGKYK	273
20	PLQVERTLIYYLDE	262

FIGURA 14

1 MARGPGLAPP PLRLPLLLL LV LAAVTGHTAA QDNCTCPTNK MTVCSPDGPG
51 GRCQCRALGS GMAVDCSTLT SKCLLLKARM SAPKNARTLV RPSEHALVDN
101 DGLYDPDCDF EGRFKARQCN QTSVCWCVNS VGVRRTDKGD LSLRCDDLVR
151 THHILIDLRH RPTAGAFNHS DLDAELRR**LF** **RERYRL**HPKF VAAVHYEQPT
201 IQIELRQNTS QKAAGEVDIG DAAYYFERDI KGESLFQGRG GLDLRVRGEP
251 L**QVERTLIYY** LDEIPPKFSM KRLTAGLIAV IVVVVVALVA GMAVLVITNR
310 RKSGKYKKVE IKELGELRKE PSL

FIGURA 15

Código de Cebador	Secuencia	Longitud	Nombre-Fondo
OL024	ATGRAGWCACAKWCYCAGGTCTTT	24	MulgkV _L 5'-LA
OL025	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT	25	MulgkV _L 5'-LB
OL026	ATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT	29	MulgkV _L 5'-LC
OL027	ATGAGGRCCCCCTGCTCAGWTTTGTGGIWTCTT	32	MulgkV _L 5'-LD
OL028	ATGGGCWTCALGATGRAGTCACAKWYYCWGG	31	MulgkV _L 5'-LD
OL029	ATGAGTGTGCYCACTCAGGTCCTGGSGTT	29	MulgkV _L 5'-LE
OL030	ATGTGGGGAYCGKTTTYAMMCCTTTCAATTG	31	MulgkV _L 5'-LE
OL031	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC	28	MulgkV _L 5'-LE
OL032	ATGAGIMMKTCIMTTCAITTCYTGGG	26	MulgkV _L 5'-LF
OL033	ATGAKGTHCYCIGCTCAGYTYCTIRG	26	MulgkV _L 5'-LF
OL034	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG	25	MulgkV _L 5'-LF
OL035	ATGTATATATGTTTGTTGTCTATTTCT	27	MulgkV _L 5'-LF
OL036	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT	29	MulgkV _L 5'-LG
OL037	ATGGATTTCWARGTGCAGATTWTCAGCTT	29	MulgkV _L 5'-LG
OL038	ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTCTGG	27	MulgkV _L 5'-LG
OL039	ATGGTYCTYATVTTRCTGCTGCTATGG	27	MulgkV _L 5'-LG
OL040	ACTGGATGGTGGGAAGATGGA	21	MulgkV _L 3'-I
OL041	ATGGCCTGGAYTYCWCTYWTMYTCT	25	MulgλV _L 5'-LI
OL042	AGCTCYTCWGWWGAIGGYGGRAA	23	MulgλV _L 3'-I

FIGURA 16

Código de Cebador	Secuencia	Longitud	Nombre-Fondo
OL007	ATGRASSTSKGGYTMARCTKGRITT	25	MuIgV _H 5'-HA
OL008	ATGRAATGSASCTGGGTYWTYCTCTT	26	MuIgV _H 5'-HB
OL009	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCTT	29	MuIgV _H 5'-HC
OL010	ATGGCTGTCYTRGBGCTGYTCYTCTG	26	MuIgV _H 5'-HC
OL011	ATGGVTTGGSTGTGGAMCTTGCTATTCCT	29	MuIgV _H 5'-HC
OL012	ATGAAATGCAGCTGGRTYATSTTCTT	26	MuIgV _H 5'-HD
OL013	ATGGRCAGRCTTACWYYTCATTCCT	26	MuIgV _H 5'-HD
OL014	ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCT	26	MuIgV _H 5'-HD
OL015	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	26	MuIgV _H 5'-HE
OL016	ATGAAGWTGTGGBTRAACCTGGRT	23	MuIgV _H 5'-HE
OL017	ATGGRA'GGASCKKIRTCTTTMTCT	25	MuIgV _H 5'-HE
OL018	ATGAACTTYGGGYTSAGMTTGRTTT	25	MuIgV _H 5'-HF
OL019	ATGTACTTGGGACTGAGCTGTGTAT	25	MuIgV _H 5'-HF
OL020	ATGAGAGT'GCTGATTCTTTTGTG	23	MuIgV _H 5'-HF
OL021	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATIG	28	MuIgV _H 5'-HF
OL023	CCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG	26	MuIgGV _H 3'-2

FIGURA 17

CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGASACAGTCAAGATCTCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACA 90
 GTC TAGGTCAACCAGGTCAGACCTGGACTCGACTTCTTGGACCTCTCTGTCAGTTCTAGAGACGTTCCGAAGACCCATATGGAAGTGT
 Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S C K A S G Y F T
 AACTATGGAATGAAGTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAAACACCAAAAACCTGGAGAGCCCAACATAT 18
 TTGATACCTTACTTGACCCCACTTGGTCCGAGGTCCCTTCCCAAATTTCACCTACCGGACCTATTTGGGTTTGGACCTCTCGGTTGTATA
 N Y G M N W V K Q A P G K G L K W M G W I N T K T G E P T Y
 GCTGAAGAGTTCAAGGACGGTTTGCTTCTCTTTGGAAACCTTGCCAGCAGCTGCCTATTGTCAGATCAACAACCTCAAAAAAGAGGAC 27
 CGACTTCTCAAGTTCCTTGCCTGCAACGGAAGAGAAACCTTTGGAGACGGTCTGACGGATAAACGTCTAGTTGTGGAGTTTTTTCCTCTG
 A E E F K G R F A F S L E T S A S T A Y L Q I N N L K K E D
 ACGGCTACATATTTCTGTGGAAGAGGGGGCTACGGTAGTAGCTACTGGTACTTTCGATGTCTGGGGGGCGAGGACCAAGGTCACCGTCTCC 36
 TGCCGATGTATAAGACACCTTCTCCCCCGATGCCATCATCGATGACCATGAAGCTACAGACCCCGGCTCCCTGGTCCAGTGGCAGAGG
 T A T Y F C G R G G Y G S S Y W Y F D V W G A G T T V T V S

TCA 363

AGT

S

FIGURA 18

90

GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTCATCTGTGGAGAAACTGTCCACCATCACATGTCGAGCAAGTGAGAAATTTTAC
CTGTAGGTCTACTGAGTCAGAGGTCGGAGGGATAGACGTAGACACCTCTTTGACAGTGGTAGTGACAGCTCGTCACTCTTATAAATG

D I Q M T Q S P A S L S A S V G E T V T I T C R A S E N I Y

18

AGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGAAAGGTGTGCCATCA
TCAATAAATCGTACCATAGTCGTCTTTGTCCCTTTTAGAGGAGTCGAGGACCAGATATACGTTTTTTGGAAATCGTCTTCCACACGGTAGT

S Y L A W Y Q Q K Q G K S P Q L L V Y N A K T L A E G V P S

18/29

27

AGGTTCAGTGGCAGTGGTTCAGGCACACAGTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGGGCCCTGAAGATTTTGGAGATTACTGTCAACAT
TCCAAGTCACCGTCACCCAGTCCGCTGTGTCAAAAGAGACTTCTAGTGTGGGACGCCGGACTTCTAAACCCCTCAATAATGACAGTTGTA

R F S G S G S G T Q F S L K I N S L R P E D F G S Y Y C Q H

321

CATTATGGTTCTCCGCTCACGTTCCGTTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAGA
GTAATACCAAGAGGGGAGTGCAAGCCACGACCTGGTTCGACCTCGACTCT

H Y G S P L T F G A G T K L E L R

FIGURA 19

Código de Oligonucleótido	Secuencia	Longitud
OL 334	GATCACGCGTGTCCACTCCAGATCCAGTTGGTGCAGTC	39
OL 335	GTACAAAGCTTACCTGAGGAGACGGTGACCCGTGG	33
OL 368	GATCACGCGTGTCCACTCCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAA	54
OL 369	CAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGCGTCAGTCAAGGTCTCCTGCAA	53
OL 370	TAAACCTGTCTGGAGCCTGCGGCACCCAGTTC	34
OL 371	CAGGCTCCAGGACAGGGTTTAGAGTGGATGGGC	33
OL 372	TGCTGATCTGCAAAATAGGCAGTGTCTGGCAGAGGTTTCCAAAGAGAACACCGTCC	58
OL 373	CTGCCTATTTGCAGATCAGCAGCCTCAAAGCAGAGGACACGGCTATGTATTTCTGTG	57
OL 374	CTAGAAAGCTTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCCAGACA	50
OL 375	GATCACGCGTGTCCACTCCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACATGAGGTGAAGAAGCC	60
OL 376	AATACATAGCCATGTCCTCTGC	22
OL 377	GCAGAGGACATGGCTATGTATT	22
OL 378	AGAGGACATGGCTATGTATTACTGTGGAAGA	31
OL 379	CTGGCAGAGGTGTCCCAAAGAGA	22
OL 380	TCTCTTTGGACACCTCTGCCAG	22
OL 381	GATCACGCGTGTCCACTCCAGGTCCAGTTGGTG	34
OL 382	GAGGTGTCCATAGAGAAGACA	21
OL 383	TGTCTTCTCTATGGACACCTC	21
OL 384	AGCCCCCTCTTGCACAGTAATA	22
OL 385	TATTACTGTGCAAGAGGGGGCT	22

FIGURA 20

Código de Oligonucleótido	Secuencia	Longitud
OL 336	CATGGCGCGGATGTGACATTGTGATGACCCAGTC	35
OL 337	TGCGGATCCAACTGAGGAAGCAAAAGTTTAAATTCTACTACAGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCC	63
OL 386	GATCGCGCGGATGTGACATTGTGATGACCCAGTCTCCTCATTCCTGTCCGCGCATCAGTAGG	62
OL 387	ATTCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATCACCTGTC	43
OL 388	ACTTTAGGAGCTTTTCTCTGGTTTC	24
OL 389	GAAACCAAGGAAAAGTCTCTAAAGT	24
OL 390	GTCTTCAGCCTGCAGAGAACTGATGGTG	28
OL 391	GTCTCTGCAAGCTGAAGACATCGCAGTTTATT	33
OL 392	GATCGGATCCAACTGAGGAAGCAAAAGTTTAAATTCTACTACAGTTTAACTCCACCTTGGTCCCAACCCGAAAG	75
OL 393	GATCGCGCGGATGTGACATTGTGATGACCCAGTCTCCTCATCCTCTGTCCGCA	54
OL 394	CGATGTCTTCAGGCTGCAGAGAAC	24
OL 395	GTCTCTGCAAGCTGAAGACATCG	24
OL 396	GATCGCGCGGATGTGACATTGACATGACCCAGT	34
OL 397	TCCACTGCCACTGAAAGCGATC	21
OL 398	GATCGCTTCAGTGGCAGTGA	21
OL 399	CATGAAGCGACTAGGGACTCCA	23
OL 400	TGGAGTCCCTAGTCCCTTCAGTG	23
OL 401	TCTGCAGCCTGAAGACATCGCAACTTATTACTGTC	35

FIGURA 21

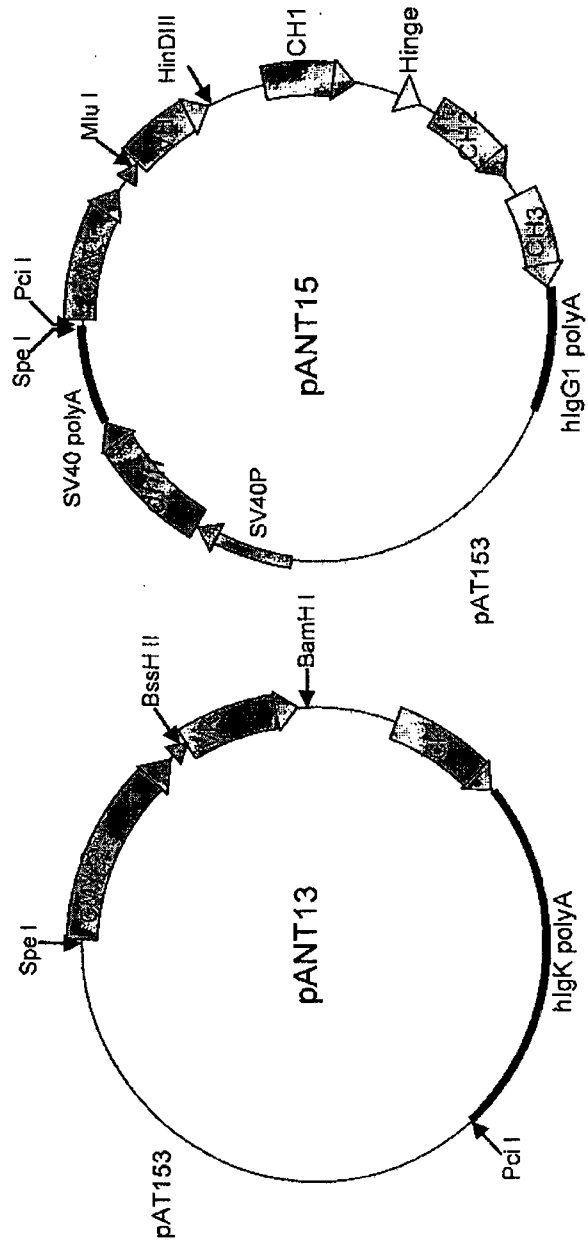


FIGURA 22A

HV6 cadena pesada:

Q I Q L V Q S G H E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G -----CD
30

10 20 30

R1--
M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E P T Y A E E F K G R -----CDR2-----
60

40 50 60

F V F S M D T S A S T A Y L Q I S S L K A E D M A M Y Y C G R G G -----CD
90

70 80 90

R3--
Y G S S Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S 110

100 A B C D

HV5 cadena pesada:

Q I Q L V Q S G H E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G -----CD
30

10 20 30

R1--
M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E P T Y A E E F K G R -----CDR2-----
60

40 50 60

F V F S L D T S A S T A Y L Q I S S L K A E D M A M Y Y C G R G G -----CD
90

70 80 90

R3--
Y G S S Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S 110

100 A B C D

FIGURA 22B

HV4 Cadena Pesada:

Q I Q L V Q S G H E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G
 10 20 30
 R1--
 M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E P T Y A E E F K G R
 40 50 52A 60
 F V F S L E T S A S T A Y L Q I S S L K A E D M A M Y Y C G R G G
 70 80 82A B C 90
 R3--
 Y G S S Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S
 100 A B C D 110

HV3 Cadena Pesada:

Q I Q L V Q S G H E V K K P G A S V X V S C K A S G Y T F T N Y G
 10 20 30
 R1--
 M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E P T Y A E E F K G R
 40 50 52A 60
 F V F S L E T S A S T A Y L Q I S S L K A E D M A M Y Y C G R G G
 70 80 82A B C 90
 R3--
 Y G S S Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S
 100 A B C D 110

FIGURA 22C

HV2 Cadena Pesada:

Q I Q L V Q S G H E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G
 10 20 30
 R1--
 M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E P T Y A E E F K G R
 40 50 52A 60
 F V F S L E T S A S T A Y L Q I S S L K A E D T A M Y F C G R G G
 70 80 82A B C 90
 R3--
 Y G S S Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S
 100 A B C D 110

HV1 Cadena Pesada:

Q I Q L V Q S G P E L K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G
 10 20 30
 R1--
 M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E P T Y A E E F K G R
 40 50 52A 60
 F V F S L E T S A S T A Y L Q I S S L K A E D M A M Y F C G R G G
 70 80 82A B C 90
 R3--
 Y G S S Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S
 100 A B C D 110

FIGURA 23A

KV5 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 K A S Q D V S I A V
 10 20 30
 -----CDR1-----
 A W Y Q Q K P G K A P K V L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S
 40 50 60
 -----CDR2-----
 G T D F T F T I S S L Q P E D I A T Y Y C Q Q H Y I T P L T F G G
 70 80 90 100
 -----CDR3-----
 G T K V E I K
 106A

KV4 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 K A S Q D V S I A V
 10 20 30
 -----CDR1-----
 A W Y Q Q K P G K A P K V L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S
 40 50 60
 -----CDR2-----
 G T D F T F T I S S L Q P E D I A V Y Y C Q Q H Y I T P L T F G G
 70 80 90 100
 -----CDR3-----
 G T K V E I K
 106A

FIGURA 23B

KV3 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 K A S Q D V S I A V
 10 20 30 CDR1
 A W Y Q Q K P G K A P K V L I Y S A S Y R Y T G V P D R F S G S G S
 40 50 60 CDR2
 G T D F T F T I S S L Q P E D I A V Y Y C Q Q H Y I T P L T F G G
 70 80 90 100 CDR3
 G T K V E I K
 106A

KV2 Cadena Ligera:

D I V N T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I A V
 10 20 30 CDR1
 A W Y Q Q K P G Q A P K V L I Y S A S Y R Y T G V P D R F T G S G S
 40 50 60 CDR2
 G T D F T F T I S S L Q P E D I A V Y Y C Q Q H Y I T P L T F G G
 70 80 90 100 CDR3
 G T K V E I K
 106A

KV1 Cadena Ligera:

```

D I V M T Q S P S F L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I A V
10
--
A W Y Q Q K P G K A P K V L I Y S A S Y R Y T G V P D R F T G S G S
40
--
G T D F T F T I S S L Q A E D I A V Y Y C Q Q H Y I T F L T F G G
70
--
G T K V E I K
106A

```

FIGURA 24

Matriz: relación unión observada/esperada

	VH0	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6
VK0	0.963	1.068	0.965	0.916	1.574	1.579	4.836
VK1	0.965	1.029	0.997	1.025	1.689	1.873	4.366
VK2	1.158	1.189	1.067	1.077	1.732	1.885	4.489
VK3	1.015	0.989	1.142	1.057	1.825	1.788	3.853
VK4	1.047	1.118	0.946	1.032	1.701	1.687	4.122
VK5	1.291	1.248	1.334	1.844	1.968	1.969	4.269

FIGURA 25

Anticuerpo	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
AR47A6.4.2*	3.03E-09	1.29E+05	3.81E-04
Variante HV2/KV3 de (hu)AR47A6.4.2	6.90E-10	2.86E+05	1.97E-04
Variante HV2/KV4 de (hu)AR47A6.4.2	6.97E-10	3.01E+05	2.10E-04
Variante HV3/KV3 de (hu)AR47A6.4.2	6.13E-10	2.89E+05	1.77E-04
Variante HV3/KV4 de (hu)AR47A6.4.2	6.31E-10	2.83E+05	1.78E-04

* Promedio de 3 experimentos independientes

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> YOUNG, DAVID S. F.
FINDLAY, HELEN P.
HAHN, SUSAN E.
DACRUZ, LUIS A. G.
FERRY, ALISON L.
- 5 <120> MEDIACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE CÉLULAS QUE
EVIDENCIAN EXPRESIÓN SUPERFICIAL DE TROP-2
- <130> 2056.092
- <140> 11/807,837
<141> 2007-05-30
- <150> 11/709,676
<151> 2007-02-22
- <150> 60/776,466
<151> 2006-02-24
- 10 <160> 117
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético
- 15 <400> 1
Asn Tyr Gly Met Asn
1 5
- <210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido
sintético
- 20 <400> 2
Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Lys
1 5 10 15
- Gly
- <210> 3
<211> 12
<212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 3
 Gly Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10

5
 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 4
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala Val Ala
 1 5 10

10
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 5
 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5

15
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

<400> 6
 Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu Thr
 1 5

20
 <210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

25
 <400> 7
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly His Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 5 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
 85 90 95
 10 Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 8
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
 sintético
 <400> 8
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 25 Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
 85 90 95

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

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 9

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

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

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

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

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

15 Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
85 90 95

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

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 10

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

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

25 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

5 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Met Ala Met Tyr Phe Cys
85 90 95

Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

10 <210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

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

<400> 11
Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His
1 5

15 <210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

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

<400> 12
Gln Val Glu Arg Thr Leu Ile Tyr Tyr
1 5

20 <210> 13
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

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

25 <400> 13
Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His Pro Lys Phe
1 5 10

- <210> 14
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

 <400> 14
 5 Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His Pro Lys Phe Val
 1 5 10
- <210> 15
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

 <400> 15
 10 Gly Met Ala Val Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys Ser Gly
 1 5 10
- <210> 16
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

 <400> 16
 15 Met Ala Val Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys Ser Gly Lys
 1 5 10
- <210> 17
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

 <400> 17
 20 Leu Val Ala Gly Met Ala Val Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg
 1 5 10
- <210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 25

- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <400> 18
Ala Val Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys Ser Gly Lys Tyr
1 5 10
- 5 <210> 19
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <400> 19
Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His
1 5 10
- 10 <210> 20
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <400> 20
Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His Pro Lys Phe Val Ala
1 5 10
- 15 <210> 21
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <400> 21
Leu Phe Gln Gly Arg Gly Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly
1 5 10
- 20 <210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
- 25 <400> 22
Val Ala Gly Met Ala Val Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys
1 5 10

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

```
<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
```

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

```
<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
```

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

```
<210> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
```

20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 26
Ala Gly Met Ala Val Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys Ser
1 5 10

```
<210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
```

25 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 27

Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys Ser Gly Lys Tyr Lys Lys
1 5 10

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 28

Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu
1 5 10

<210> 29

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 29

Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His Pro Lys
1 5 10

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 30

Leu Asp Ala Glu Leu Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg
1 5 10

<210> 31

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 31

Val Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys Ser Gly Lys Tyr Lys
1 5 10

<210> 32
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

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

5 <400> 32
 Pro Leu Gln Val Glu Arg Thr Leu Ile Tyr Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10

<210> 33
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 33
 Met Ala Arg Gly Pro Gly Leu Ala Pro Pro Pro Leu Arg Leu Pro Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Val Leu Ala Ala Val Thr Gly His Thr Ala Ala Gln Asp
 20 25 30

Asn Cys Thr Cys Pro Thr Asn Lys Met Thr Val Cys Ser Pro Asp Gly
 35 40 45

Pro Gly Gly Arg Cys Gln Cys Arg Ala Leu Gly Ser Gly Met Ala Val
 50 55 60

15 Asp Cys Ser Thr Leu Thr Ser Lys Cys Leu Leu Leu Lys Ala Arg Met
 65 70 75 80

Ser Ala Pro Lys Asn Ala Arg Thr Leu Val Arg Pro Ser Glu His Ala
 85 90 95

Leu Val Asp Asn Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Pro Glu Gly
 100 105 110

20 Arg Phe Lys Ala Arg Gln Cys Asn Gln Thr Ser Val Cys Trp Cys Val
 115 120 125

Asn Ser Val Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Gly Asp Leu Ser Leu Arg
 130 135 140

Cys Asp Asp Leu Val Arg Thr His His Ile Leu Ile Asp Leu Arg His
 145 150 155 160

25 Arg Pro Thr Ala Gly Ala Phe Asn His Ser Asp Leu Asp Ala Glu Leu
 165 170 175

Arg Arg Leu Phe Arg Glu Arg Tyr Arg Leu His Pro Lys Phe Val Ala
180 185 190

Ala Val His Tyr Glu Gln Pro Thr Ile Gln Ile Glu Leu Arg Gln Asn
195 200 205

5 Thr Ser Gln Lys Ala Ala Gly Glu Val Asp Ile Gly Asp Ala Ala Tyr
210 215 220

Tyr Phe Glu Arg Asp Ile Lys Gly Glu Ser Leu Phe Gln Gly Arg Gly
225 230 235 240

Gly Leu Asp Leu Arg Val Arg Gly Glu Pro Leu Gln Val Glu Arg Thr
245 250 255

10 Leu Ile Tyr Tyr Leu Asp Glu Ile Pro Pro Lys Phe Ser Met Lys Arg
260 265 270

Leu Thr Ala Gly Leu Ile Ala Val Ile Val Val Val Val Val Ala Leu
275 280 285

Val Ala Gly Met Ala Val Leu Val Ile Thr Asn Arg Arg Lys Ser Gly
290 295 300

15 Lys Tyr Lys Lys Val Glu Ile Lys Glu Leu Gly Glu Leu Arg Lys Glu
305 310 315 320

Pro Ser Leu

<210> 34

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador
sintético

<400> 34

atgragwcac akwcycaggt cttt

24

<210> 35

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador
sintético

	<400> 35 atggagacag acacactcct gctat	25
	<210> 36 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
5	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 36 atggagwcag acacactsct gytatgggt	29
	<210> 37 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<220> <221> modified_base <222> (27)..(27) <223> Inosine	
	<400> 37 atgaggrccc ctgctcagwt tyttggnwtc tt	32
15	<210> 38 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 38 atgggcwtca agatgragtc acakwyycwg g	31
20	<210> 39 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 39 atgagtgtgc ycactcaggt cctggsgett	29
25	<210> 40	

<211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

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

 <400> 40
 atgtggggay cgktttyamm cttttcaatt g 31
 5

<210> 41
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

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

 <400> 41
 atggaagccc cagctcagct tctcttcc 28
 10

<210> 42
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

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

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (6)..(6)
 <223> Inosina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> Inosina

 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (18)..(18)
 <223> Inosina

 <400> 42
 atgagnmmkt cnmttcantt cytggg 26
 20

<210> 43
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

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

 <220>
 25

	<221> base_modificada <222> (12)..(12) <223> Inosina <220> <221> base_modificada <222> (24)..(24) <223> Inosina <400> 43	26
5	atgakgthcy cngctcagyt yctnrg	
	<210> 44 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético <400> 44	25
10	atggtrtccw casctcagtt ccttg	
	<210> 45 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético <400> 45	27
15	atgtatatat gtttggtgct tatttct	
	<210> 46 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético <400> 46	29
20	atgaagttgc ctgtaggct gttggtgct	
	<210> 47 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético <400> 47	29
25	atggatttwc argtgcagat twtcagctt	

	<210> 48 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
5	<400> 48 atggyctya tvtccttgct gttctgg	27
	<210> 49 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
10	<400> 49 atggyctya tvtttrctgct gctatgg	27
	<210> 50 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
15	<400> 50 actggatggt gggaagatgg a	21
	<210> 51 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
20	<400> 51 atggcctgga ytycwctywt mytct	25
	<210> 52 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
25		

	<220>		
	<221>	base_modificada	
	<222>	(15)..(15)	
	<223>	Inosina	
	<400>	52	
		agctcytcwg wgganggygg raa	23
5	<210>	53	
	<211>	25	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400>	53	
		atgrasttsk ggytmarctk grttt	25
10	<210>	54	
	<211>	26	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400>	54	
		atgraatgsa sctgggtywt yctctt	26
15	<210>	55	
	<211>	29	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400>	55	
		atggactcca ggctcaattt agttttcct	29
20	<210>	56	
	<211>	26	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400>	56	
		atggctgtcy trgbgctgyt cytctg	26
25	<210>	57	
	<211>	29	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 57	
	atggvttggs tgtggamctt gcyattcct	29
5		
	<210> 58	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 58	
	atgaaatgca gctggrtyat sttctt	26
10		
	<210> 59	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 59	
	atggrcagrc ttacwtytc attcct	26
15		
	<210> 60	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 60	
	atgatggtgt taagtcttct gtacct	26
20		
	<210> 61	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 61	
	atgggatgga gctratcat sytctt	26
25		

	<210> 62	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
5	<400> 62 atgaagwtgt ggbtraactg grt	23
	<210> 63	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
10	<220> <221> base_modificada <222> (15)..(15) <223> Inosina	
	<400> 63 atggratgga sckknrtctt tmtct	25
	<210> 64	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 64 atgaacttyg ggytsagmtt grttt	25
	<210> 65	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 65 atgtacttgg gactgagctg tgtat	25
	<210> 66	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	

	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 66 atgagagtgc tgattctttt gtg	23
5	<210> 67 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<400> 67 atggattttg ggctgatttt ttttattg	28
10	<210> 68 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético	
	<220> <221> base_modificada <222> (21)..(21) <223> Inosina	
15	<400> 68 ccaggrcca rkkgatarac ngrtgg	26
	<210> 69 <211> 363 <212> ADN <213> Mus musculus	
	<220> <221> CDS <222> (1)..(363)	
20	<400> 69 cag atc cag ttg gtg cag tct gga cct gag ctg aag aag cct gga gag Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu 1 5 10 15	48
	aca gtc aag atc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ttc aca aac tat Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr 20 25 30	96
	gga atg aac tgg gtg aag cag gct cca gga aag ggt tta aag tgg atg Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met 35 40 45	144
25	ggc tgg ata aac acc aaa act gga gag cca aca tat gct gaa gag ttc Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe 50 55 60	192

aag gga cgg ttt gcc ttc tct ttg gaa acc tct gcc agc act gcc tat 240
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

ttg cag atc aac aac ctc aaa aaa gag gac acg gct aca tat ttc tgt 288
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Lys Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

5 gga aga ggg ggc tac ggt agt agc tac tgg tac ttc gat gtc tgg ggc 336
 Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

gca ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 363
 Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 70
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400> 70
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

15 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Lys Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

20 Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 71
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

25 <220>
 <221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 71

gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct gca tct gtg gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt gag aat att tac agt tat 96
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30

5 tta gca tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg gtc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45

tat aat gca aaa acc tta gca gaa ggt gtg cca tca agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tca ggc aca cag ttt tct ctg aag atc aac agc ctg cgg cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Arg Pro
 65 70 75 80

10 gaa gat ttt ggg agt tat tac tgt caa cat cat tat ggt tct ccg ctc 288
 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ser Pro Leu
 85 90 95

acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aga 321
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg
 100 105

<210> 72

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

15

<400> 72

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

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

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

20

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

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

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Ser Pro Leu
 85 90 95

25

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg

100

105

5	<210> 73 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 73 gatcacgcgt gtccactccc agatccagtt ggtgcagtc	39
10	<210> 74 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 74 gtacaagctt acctgaggag acggtgaccg tgg	33
15	<210> 75 <211> 54 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 75 gatcacgcgt gtccactccc agatccagtt ggtgcagtct ggacctgagc tgaa	54
20	<210> 76 <211> 53 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 76 cagtctggac ctgagctgaa gaagcctgga gcgtcagtca aggtctcctg caa	53
25	<210> 77 <211> 34 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	

- <400> 77
taaaccctgt cctggagcct gcggcaccca gttc 34
- <210> 78
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 78
caggctccag gacagggttt agagtggatg ggc 33
- <210> 79
<211> 58
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 79
tgctgatctg caaataggca gtgctggcag aggtttccaa agagaagaca aaccgtcc 58
- <210> 80
<211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 80
ctgcctatTT gcagatcagc agcctcaaag cagaggacac ggctatgtat ttctgtg 57
- <210> 81
<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 81
ctagaagctt acctgaggag acggtgaccg tggcccttg gccccagaca 50
- <210> 82
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 25 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 82
 gatcacgcgt gtccactccc agatccagtt ggtgcagtct ggacatgagg tgaagaagcc 60
 <210> 83
 <211> 22
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 83
 aatacatagc catgtcctct gc 22
 <210> 84
 <211> 22
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 84
 gcagaggaca tggctatgta tt 22
 <210> 85
 <211> 31
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 85
 agaggacatg gctatgtatt actgtggaag a 31
 <210> 86
 <211> 22
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 86
 ctggcagagg tgtccaaaga ga 22
 <210> 87
 <211> 22
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400>	87	
		tctctttgga cacctctgcc ag	22
5	<210>	88	
	<211>	34	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400>	88	
		gatacgcgt gtccactccc aggtccagtt ggtg	34
10	<210>	89	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400>	89	
		gaggtgtcca tagagaagac a	21
15	<210>	90	
	<211>	21	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400>	90	
		tgtcttctct atggacacct c	21
20	<210>	91	
	<211>	22	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400>	91	
		agccccctct tgcacagtaa ta	22
25	<210>	92	
	<211>	22	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 92	
	tattactgtg caagaggggg ct	22
5		
	<210> 93	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 93	
	catggcgcg gatgtgacat tgtgatgacc cagtc	35
10		
	<210> 94	
	<211> 63	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 94	
	tgcgggatcc aactgaggaa gcaaagtta aattctactc acgtttcagc tccagcttgg	60
15	tcc	63
	<210> 95	
	<211> 62	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 95	
	gatcgcgcg gatgtgacat tgtgatgacc cagtctccct cattcctgtc cgcacagta	60
20	gg	62
	<210> 96	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
25		

	<400> 96 attcctgtcc gcatcagtag gagacagggt caccatcacc tgc	43
	<210> 97 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
5	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 97 actttaggag cttttcctgg tttc	24
	<210> 98 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 98 gaaaccagga aaagtccta aagt	24
	<210> 99 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 99 gtcttcagcc tgcagagaac tgatggtg	28
	<210> 100 <211> 33 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 100 gttctctgca ggctgaagac atcgagttt att	33
	<210> 101 <211> 75 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido	

sintético

	<400> 101	
	gacgcatcc aactgaggaa gcaaagtta aattctactc acgtttaatc tccaccttgg	60
	tcccaccacc gaacg	75
5	<210> 102	
	<211> 54	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 102	
	gacgcgcgc gatgtgacat tgtgatgacc cagtctcct catccctgtc cgca	54
10	<210> 103	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 103	
	cgatgtcttc aggctgcaga gaac	24
15	<210> 104	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 104	
	gttctctgca gcctgaagac atcg	24
20	<210> 105	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético	
	<400> 105	
	gacgcgcgc gatgtgacat tcagatgacc cagt	34
25	<210> 106	
	<211> 21	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 106 tccactgcc a ctgaagcgat c	21
5	<210> 107 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 107 gatcgcttca gtggcagtg a	21
10	<210> 108 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 108 cactgaagcg actagggact cca	23
15	<210> 109 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 109 tggagtcct agtcgcttca gtg	23
20	<210> 110 <211> 35 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
	<400> 110 tctgcagcct gaagacatcg caacttatta ctgtc	35
25	<210> 111	

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

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

<400> 111
 5 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly His Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 10 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Met Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Met Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 15 Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 112
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 112
 25 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly His Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

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

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

5

Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

10

<210> 113
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

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

<400> 113
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly His Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

15

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

20

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

Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

25

<210> 114

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

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

<400> 114

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

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

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

10 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Met Ala Met Tyr Phe Cys
 85 90 95

15 Gly Arg Gly Gly Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 115
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 115

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

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

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

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

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 His Tyr Ile Thr Pro Leu
85 90 95

5

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

<210> 116

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético

<400> 116

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

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

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

15

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

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

Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
85 90 95

20

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

<210> 117

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido
sintético

<400> 117

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

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

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

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

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

10 Glu Asp Ile Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ile Thr Pro Leu
 85 90 95

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

TRADUCCION OFICIAL No. 2009-11-25-621
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

PCT/CA2008/000979

Hoja No 4

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;

da CRUZ, Luis A. G., 57 Nipigon Avenue, Toronto, Notario M2M 2V9 CANADA; and

FERRY, Alison L., 143 Grenadier Crescent, Thomhill, Ontario L4J 7V6 CANADA.

a ARIUS RESEARCH, INC., fechado el 23 de Febrero de 2006, 23 de Febrero de 2006, 23 de Febrero de 2006, 23 de Febrero de 2006 y 23 de Febero 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

252

Sheet No. ...4...

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;

da CRUZ, Luis A. G., 57 Nipigon Avenue, Toronto, Ontario M2M 2V9 CANADA; and

FERRY, Alison L., 143 Grenadier Crescent, Thornhill, Ontario L4J 7V6 CANADA

to ARIUS RESEARCH, INC., dated 23 February 2006, 23 February 2006, 23 February 2006, 23 February 2006, and 23 February 2006, respectively.

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

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PATENTE DE INVENCION [X]

MODELO DE UTILIDAD []

- ♦ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X] 1
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X] 1
- ♦ Descripción de la invención [X] 33
- ♦ Dibujos de ser estos pertinentes [] 89
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas [X] 2

COMPLETA [X]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ♦ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ♦ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ♦ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ♦ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ♦ Representación gráfica del esquema trazado []
- ♦ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Erwin Lopez
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-135218- -00000-0000

Fecha: 2009-11-26 17:21:43 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE IYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 253



2020

Bogotá D.C.,

Doctor(a)

LLOREDA RICAURTE ALICIA

Apoderado(a) y/o Representante de

F. HOFMANN-LA ROCHE AG.

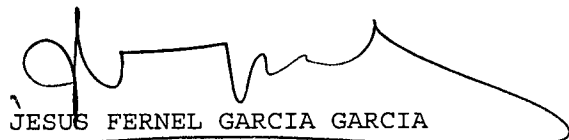
REFERENCIA	Radicación No.	09 135218
	Solicitud internacional	PCT/CA2008/000979
	Fecha inicio fase nacional	30/12/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	9767
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase

Dado en Bogotá DC,

14 ENE. 2010


JESUS FERNEL GARCIA GARCIA
Director de Nuevas Creaciones (E)

adpall