SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SIC

CSA125678

PCT

Organización y Digitalización CSA Ltda

INVENTARIO

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. **EXPEDIENTE No.** 10-79501 ½

54. **TITULO** CONJUGADO ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-B7H4-FÁRMACO Y MÉTODOS DE UTILIZACIÓN

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL**

71. **SOLICITANTE** BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

DOMICILIO PRINCETON, NJ, US.

74. **APODERADO** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

22. **BOGOTÁ, D.C.**

(FORMA P 10)

Oficina de Comunicaciones

AS: 114.153

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-079501- -00000-0000
Fecha: 2010-06-30 17:59:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 388

FORMULARIO ÚNICO 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	Nombre: **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** Dirección: 300 Park Avenue New York, NY 10022, US. Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América. Lugar de Constitución: Estados Unidos de América. Teléfono: Fax: E-mail	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO Dirección: Calle 70ª #4 – 41, Bogotá, Colombia. Teléfono: 744-2200 Fax: 742-2200 E-mail:	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 80.410.337 TP 57492
	En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el numero de radicación (del poder). _____	
4 INVENTOR (ES) (72)	**Nombre**: Jonathan A.TERRETT, Josephine M. CARDARELLI, Chetana RAO-NAIK, Bingliang CHEN, David J. KING. **Dirección**: 521 Cottonwood Drive Milpitas, CA 95035, US; 521 Cottonwood Drive Milpitas, CA 95035, US; 521 Cottonwood Drive Milpitas, CA 95035, US; 521 Cottonwood Drive Milpitas, CA 95035, US; 8875 Costa Verde Blvd. # 412 San Diego, CA 92122, US (respectivamente). **Nacionalidad o Domicilio**: Estados Unidos de América.	

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US08/084923 Fecha 26.11.2008
Publicación Internacional No WO 2009/07353 A3 Fecha 11.06.2009

6 Título (54): CONJUGADO ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-B7H4-FÁRMACO Y MÉTODOS DE UTILIZACIÓN

7 Clasificación Internacional (51): _____

8 Prioridad SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	30.11.2007	60/991,693

9 Comprobante de pago No. 10-47.542; 10-29.230; 10-40.875; 10-40.865; 10-40.866 **Fecha** 30-06-2010

10 **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. $ 554.000
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal de la persona jurídica peticionaria, en cuanto no estén inscritas en alguna Cámara de Comercio Colombiana.
- [x] Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada.**
- [x] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. **Fotocopia autenticada.**
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- [ ] Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] 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.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] 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, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros: Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales. $ 754.000 (29*$26.000)
  - Listado de Secuencias

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:

12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**

FIRMA:

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

114153

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 47,542
FECHA : JUNIO 10 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-079501- -00000-0000

Fecha: 2010-06-30 17:59:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 388

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754397	353715515	10/06/2010	45,711,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN		554,000.00
		TOTAL :	$	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

114153

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 29,230
FECHA : ABRIL 15 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-079501- -00000-0000
Fecha: 2010-06-30 17:59:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 388

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80662271	15/04/2010	44,633,600.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	520,000.00
		TOTAL : $	520,000.00

SON: QUINIENTOS VEINTE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

114153

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 40,875
FECHA : MAYO 19 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-079501- -00000-0000
Fecha: 2010-06-30 17:59:51 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 388

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
[redacted]RIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80662201	19/05/2010	38,050,400.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	130,000.00
		TOTAL : $	130,000.00

SON: CIENTO TREINTA MIL PESOS

[redacted]SPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

114153

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 40,865
FECHA : MAYO 19 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-079501- -00000-0000
Fecha: 2010-06-30 17:59:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 388

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAG	Vr. PAGO
RIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80662201	19/05/2010	38,050,400.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	52,000.00
		TOTAL : $	52,000.00

SON: CINCUENTA Y DOS MIL PESOS

ESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

114153

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 40,866
FECHA : MAYO 19 DE 2010

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80662201	19/05/2010	38,050,400.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	52,000.00
		TOTAL : $	52,000.00

SON: CINCUENTA Y DOS MIL PESOS

SPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2008/084923

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

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

To:

MURPHY, Anina, D.
Medarex, Inc.
521 Cottonwood Drive
Milpitas, CA 95035
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
16 April 2010 (16.04.2010)

Applicant's or agent's file reference
MEDX-0199PC1

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2008/084923

International filing date *(day/month/year)*
26 November 2008 (26.11.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

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

Name and Address
MEDAREX, INC.
707 State Road
Princeton, NJ 08540-1437
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.: 609-430-2880
Facsimile No.: 609-430-2850
E-mail address: DOCKET@MEDAREX.COM

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
MEDAREX, INC.
Route 206 & Province Line Rd.
Princeton, NJ 08540
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.: 609-430-2880
Facsimile No.: 609-430-2850
E-mail address: DOCKET@MEDAREX.COM
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

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

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

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Durand Evelyne
e-mail PT03.PCT@WIPO.INT
Telephone No. +41 22 338 74 03

PATENT COOPERATION TREATY PCT/US2008/084923

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

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

To:

MURPHY, Anina, D.
Medarex, Inc.
521 Cottonwood Drive
Milpitas, CA 95035
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
11 May 2010 (11.05.2010)

Applicant's or agent's file reference
MEDX-0199PC1

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2008/084923

International filing date *(day/month/year)*
26 November 2008 (26.11.2008)

1. The following indications appeared on record concerning:

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

Name and Address
MEDAREX, INC.
707 State Road
Princeton, NJ 08540-1437
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.: 609-430-2880
Facsimile No.: 609-430-2850
E-mail address: docket@medarex.com

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
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
Route 206 & Province Line Rd.
Princeton, NJ 08543-4000
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

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

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

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 87 20

Authorized officer
Roslik-Milliquet Ana
e-mail pt03.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 03

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
11 June 2009 (11.06.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/073533 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 47/48 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/084923

(22) International Filing Date:
26 November 2008 (26.11.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/991,693 30 November 2007 (30.11.2007) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **MEDAREX, INC.** [US/US]; 707 State Road, Princeton, NJ 08540-1437 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **TERRETT, Jonathan, A.** [GB/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). **CARDARELLI, Josephine, M.** [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). **RAO-NAIK, Chetana** [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). **CHEN, Bingliang** [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). **KING, David, J.** [GB/US]; 8875 Costa Verde Blvd. # 412, San Diego, CA 92122 (US).

(74) Agents: **MURPHY, Anina, D.** et al.; Medarex, Inc., 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US).

(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, ST, 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).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

[Continued on next page]

(54) Title: ANTI-B7H4 MONOCLONAL ANTIBODY-DRUG CONJUGATE AND METHODS OF USE

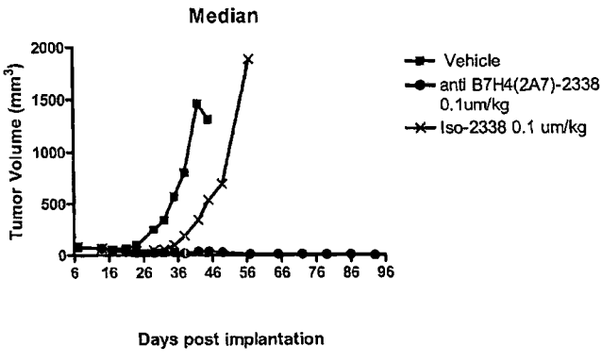


Figure 21

(57) Abstract: The present disclosure provides isolated monoclonal antibodies, particularly human monoclonal antibodies that specifically bind to B7H4 with high affinity. Nucleic acid molecules encoding the antibodies of this disclosure, expression vectors, host cells and methods for expressing the antibodies of this disclosure are also provided, hnmunoconjugates, including antibody-drug conjugates, bispecific molecules and pharmaceutical compositions comprising the antibodies of this disclosure are also provided. This disclosure also provides methods for treating cancer.

WO 2009/073533 A3

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
11 de Junio de 2009 (11.06.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/073533 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 47/48 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)

(21) Numero de Solicitud Internacional:
PCT/US2008/084923

(22) Fecha de Presentación Internacional:
26 de Noviembre de 2008 (26.11.2008)

(25) Lenguaje de entrega: Inglés

(26) Lenguaje de Publicación: Inglés

(30) Datos de la Prioridad:
60/991,693 30 de noviembre de 2007 (30.11.2007) US

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados menos los Estados Unidos)*: **MEDAREX, INNC.** [EU/EU]; 707 State Road, Princeton, NJ 08540-1437 (EU).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes *(solo para los Estados Unidos)*: **TERRETT, Jonathan, A.** [EU/EU]; 521 Cottonwood Drive Milpitas, CA 95035 (EU). **CARDARELLI, Josephine, M.** [EU/EU]; 521 Cottonwood Drive Milpitas, CA 95035 (EU). **RAO-NAIK, Chetana** [EU/EU]; 521 Cottonwood Drive Milpitas, CA 95035 (EU). **CHEN, Bingliang** [EU/EU]; 521 Cottonwood Drive Milpitas, CA 95035 (EU). **KING, David, J.** [EU/EU]; 8875 Costa Verde Blvd. # 412 San Diego, CA 92122 (EU).

(74) Agente: **MURPHY, Anina, D.;** Medarex, Inc. 521 Cottonwood Drive Milpitas, CA 95035 (EU).

(81) Estados Designados *(a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección nacional disponible)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, 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) Estados Designados *(a menos que se indique lo contrario, para todo tipo de protección regional disponible)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— *con el informe internacional de búsqueda (Art. 21(3)).*
— *Antes de la fecha limite para modificar las reivindicaciones y volver a publicar en el evento de recibir dichas modificaciones (Regla 48.2(h)).*
— *con el listado de secuencias como parte de la descripción (Regla 5.2(a)).*

(54) Título: CONJUGADO ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-B7H4-FÁRMACO Y MÉTODOS DE UTILIZACIÓN

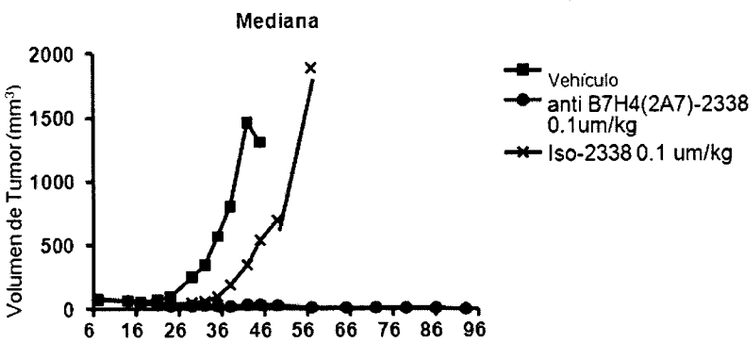


Figura 21

(57) Resumen: La presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales aislados, particularmente anticuerpos monoclonales humanos que se fijan especificamente a B7-H4 con afinidad alta. Se proporcionan también moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de esta descripción, vectores de expresión, células hospedadoras y métodos para expresión de los anticuerpos de esta descripción. Se proporcionan también inmunoconjugados, con inclusión de conjugados anticuerpo-fármaco, moléculas biespecíficas y composiciones farmacéuticas que comprenden los anticuerpos de esta descripción. Esta descripción proporciona también métodos para tratamiento del cáncer.

CONJUGADO ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-B7H4-FÁRMACO Y MÉTODOS DE UTILIZACIÓN

REMISIÓN A SOLICITUDES AFINES

Esta solicitud reivindica el beneficio con arreglo a 35 U.S.C. §119(e) de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 60/991693, presentada el 30 de noviembre de 2007; cuya descripción se incorpora en esta memoria por referencia.

Campo de la Invención

La presente invención proporciona anticuerpos anti-B7-H4, fragmentos de anticuerpo, y miméticos de anticuerpo conjugados a moléculas asociadas, tales como fármacos, radioisótopos, y toxinas.

Antecedentes de la Invención

Los cánceres de mama y ovario son las segunda y cuarta causas principales, respectivamente, de fallecimientos por cáncer en las mujeres de los Estados Unidos (American Cancer Society (2005), Cancer Facts and Figures). La American Cancer Society ha estimado que, en los Estados Unidos, aproximadamente 40.000 mujeres morirán de cáncer de mama y aproximadamente 16.000 de cáncer de ovario en 2005. Los tumores epiteliales superficiales dan cuenta de más del 80% de todas las enfermedades malignas de ovario, que incluyen tumores serosos, tumores mucinosos, tumores endometrioides y carcinomas de células claras (Seidman *et*

al. "Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract" 791-4 (Kurman, compilador, 5.ª edición, Nueva York, Springer-Verlag, 2002). Los cánceres de ovario se presentan frecuentemente en una etapa avanzada en la que la enfermedad metastásica se ha extendido a sitios regionales y distantes (Pettersson, (1994) *Int. Fed. of Gyn. and Obstetrics,* vol. 22; y Heintz *et al* (2001) *J. Epidermiol. Biostat*. 6:107-38). Por lo tanto, si bien la probabilidad de desarrollar cáncer de mama a lo largo de la vida es significativamente mayor que en el caso del cáncer de ovario, la tasa de supervivencia de 5 años para las pacientes con cáncer de mama es sustancialmente mejor que para las que sufren cáncer de ovario.

Las moléculas semejantes a B7 pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). La porción extracelular de las moléculas semejantes a B7 contienen dominios IgV e IgC simples y comparten ~ 20%-40% de identidad de aminoácidos. Las moléculas semejantes a B7 juegan papeles críticos en el control y el ajuste fino de respuestas inmunitarias específicas de antígeno. B7-H4, conocida también como O8E, B7x y B7S1, es un miembro de la familia B7 y se cree que juega un papel en la regulación tanto estimulante como inhibidora de las respuestas de las células T (Carreno *et al*, (2002) *Ann. Rev. Immunol.* 20:29-53 y Khoury *et al*, (2004) *Immunity* 20:529-538). La B7-H4 humana ha sido mapeada en el cromosoma 1 y está constituida por 6 exones y 5 intrones que abarcan 66 kb, de los cuales el exón 6 se utiliza para remodelación alternativa a fin de generar dos

transcritos diferentes (Choi *et al.* (2003) *J. Immunol.* 171:4650-4654).

B7-H4 ejerce su función fisiológica por fijación a un receptor en las células T, que induce a su vez la detención del ciclo celular e inhibe la secreción de citoquinas, el desarrollo de citotoxicidad y la producción de citoquinas de las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ (Prasad *et al.* (2003) *Immunity* 18:863-873; Sica *et al.* (2003) *Immunity* 18:849-861; Wang *et al* (2004) *Microbes Infect.* 6:759-766; y Zang *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:10388-10392). Se ha sugerido que B7-H4 puede ser un atenuador de las respuestas inflamatorias y puede desempeñar un papel en la regulación decreciente de las respuestas inmunitarias y antitumorales específicas de antígeno (Zang *et al* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100:10388-10392); Prasad *et al* (2003) *Immunity* 18:863-873; Sica *et al* (2003) *Immunity* 18:849-861; Choi *et al* (2003) *J. Immunol.* 171:4650-4654; y Carreno *et al* (2003) *Trends Immunol.* 24:524-7).

La expresión de mRNA de B7-H4, pero no de la proteína, ha sido detectada en una amplia gama de tejidos somáticos normales, con inclusión de hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas e intestino delgado (Sica *et al* (2003) *Immunity* 18:849-61 y Choi *et al.* (2003) *J. Immunol.* 171:4650-4). B7-H4 es inducible por estimulación de células T, células B, monocitos y células dendríticas; sin embargo, el análisis por inmuno-histoquímica ha revelado poca expresión en varios tejidos periféricos con la excepción de

tinción positiva en algunos cánceres de ovario y pulmón (Id.). Adicionalmente, B7-H4 se sobreexpresa consistentemente en cáncer de mama primario y metastásico, con independencia del grado o etapa del tumor, lo que sugiere un papel crítico para esta proteína en la biología del cáncer de mama (Tringler *et al.* (2005) *Clinical Cancer Res. U*:1842-48). Véanse también las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6962980; 6699664; 6468546; 6488931; 6670463 y 6528253, cada una de las cuales se incorpora por referencia en esta memoria en su totalidad.

Una gran diversidad de modalidades terapéuticas están disponibles para el tratamiento de cánceres avanzados de mama y ovario, con inclusión de radioterapia, quimioterapia convencional con agentes antitumorales citotóxicos, terapia hormonal (inhibidores de aromatasas, análogos de hormonas liberadoras de la hormona luteinizante), bisfosfonatos e inhibidores de la transducción de señales (Smith (2002) *Lancet*, 360:790-2). Lamentablemente, sin embargo, muchos pacientes o bien responden escasamente o no responden en absoluto a ninguna de estas modalidades terapéuticas. Por lo tanto, existe una necesidad de identificar nuevos indicadores moleculares para y agentes terapéuticos contra los cánceres de mama y ovario. De acuerdo con ello, B7-H4 representa una diana valiosa para el tratamiento de los cánceres, con inclusión de cánceres de ovario y de mama y una diversidad de otras enfermedades caracterizadas por la expresión de B7-H4.

Sumario de la Invención

La presente descripción proporciona conjugados anticuerpo-molécula asociada que comprenden anticuerpos monoclonales, en particular anticuerpos monoclonales de secuencia humana, que se fijan a B7-H4 (conocidos también como 08E, B7S1 y B7x) y que exhiben numerosas propiedades deseables. Estas propiedades incluyen fijación con afinidad alta a B7-H4 humana, internalización por células que expresan B7-H4, la capacidad para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, y/o la capacidad para inhibir el crecimiento de las células que expresan B7-H4 *in vivo* cuando se conjugan a una citotoxina. Se proporcionan también métodos para el tratamiento de una diversidad de enfermedades mediadas por B7-H4 utilizando los conjugados anticuerpo-molécula asociada de esta descripción.

En un aspecto, esta descripción hace referencia a conjugados anticuerpo-molécula asociada que comprenden un anticuerpo monoclonal o una porción de fijación de antígeno del mismo, en donde el anticuerpo:

(a) se fija a B7-H4 humana con una afinidad de 1 x 10^{-8} M o menos;

(b) es internalizado por las células que expresan B7-H4;

(c) exhibe citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra las células que expresan B7-H4; y

(d) inhibe el crecimiento de células que expresan B7-H4 *in vivo* cuando se conjuga a una citotoxina.

Preferiblemente, el anticuerpo exhibe al menos dos de las propiedades (a), (b), (c), y (d). Más preferiblemente, el anticuerpo exhibe al menos tres de las propiedades (a), (b), (c), y (d). Más preferiblemente, el anticuerpo exhibe las cuatro propiedades, (a), (b), (c) y (d). En otra realización preferida, el anticuerpo se fija a B7-H4 con una afinidad de 5 x 10^{-9} M o menos. En otra realización preferida adicional, el anticuerpo inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan B7-H4 *in vivo* cuando el anticuerpo está conjugado a una citotoxina.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo se fija a una línea de células tumorales de carcinoma celular de mama, tal como la línea de células SKBR3 (ATCC, No. de Acceso HTB-30).

Típicamente, el anticuerpo es un anticuerpo humano, aunque en realizaciones alternativas el anticuerpo puede ser un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico o anticuerpo humanizado.

En otra realización, el anticuerpo es internalizado por las células tumorales de carcinoma celular de mama SKBR3 después de fijación a B7-H4 expresada en dichas células.

En otra realización, esta descripción proporciona un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo monoclonal o porción de fijación de antígeno del mismo, en donde el anticuerpo compite de manera cruzada

para la fijación a B7-H4 con un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia es:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(b) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;

(c) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

(d) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; o

(e) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

En un aspecto, esta descripción hace referencia a un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo monoclonal o una porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen humano V_H 4-34 (cuyo producto proteínico se presenta en esta

memoria como SEQ ID NO: 51), en donde el anticuerpo fija específicamente B7-H4. Esta descripción proporciona también un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo monoclonal o una porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen humano V_H 3-53 (cuyo producto proteínico se presenta en esta memoria como SEQ ID NO: 52), en donde el anticuerpo fija específicamente B7-H4. Esta descripción proporciona también un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo monoclonal o una porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o se deriva de una combinación de genes humanos V_H 3-9/D3-10/JH6b (cuyo producto proteínico se presenta en esta memoria como SEQ ID NO: 53), en donde el anticuerpo fija específicamente B7-H4.

Esta descripción proporciona todavía adicionalmente un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo monoclonal o una porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen humano V_K A27 (cuyo producto proteínico se presenta en esta memoria como SEQ ID NO: 54), en donde el anticuerpo fija específicamente B7-H4. Esta descripción proporciona además un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo monoclonal o una porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o se deriva de una combinación

de genes humanos V_K L6/JK1 (cuyo producto proteínico se presenta en esta memoria como SEQ ID NO: 55), en donde el anticuerpo fija específicamente B7-H4.

En otros aspectos, esta descripción proporciona un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo monoclonal o una porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada de un gen humano V_H 4-34, 3-53 ó 3-9; y

(b) una región variable de la cadena ligera de un V_K A27 o V_K L6 humano; en donde el anticuerpo se fija específicamente a B7-H4.

En una realización afín, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de un gen humano V_H 4-34 y una región variable de la cadena ligera de un gen humano V_K A27. En otra realización afín, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de un gen humano V_H 3-53 y una región variable de la cadena ligera de un gen humano V_K A27. En otra realización afín adicional, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada de un gen humano V_H 3-9 y una región variable de la cadena ligera de un gen humano V_K L6. En otro aspecto adicional, la presente descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende: una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y

CDR3; y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde:

(a) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24 y 25 y modificaciones conservadoras de las mismas;

(b) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39 y 40 y modificaciones conservadoras de las mismas;

(c) el anticuerpo se fija a B7-H4 humana con un KD de 1 x 10^{-7} M o menos;

(d) se fija a células CHO humanas transfectadas con B7-H4.

Preferiblemente, la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 16, 17, 18, 19 y 20 y modificaciones conservadoras de las mismas; y la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34 y 35 y modificaciones conservadoras de las mismas.

Preferiblemente, la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14 y 15 y modificaciones conservadoras de las mismas; y la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29 y 30 y modificaciones conservadoras de las mismas. Una combinación particular comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 11;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 16;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 21;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 26;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 31; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 36.

Otra combinación particular comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 12;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 17;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 22;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 27;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 32; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 37.

Otra combinación particular comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 13;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 18;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 23;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 28;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 33; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 38.

Otra combinación particular comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 14;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 19;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 24;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 29;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 34; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 39.

Otra combinación particular comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 15;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 20;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 25;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 30;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 35; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 40.

Otros anticuerpos particulares de esta descripción o porciones de fijación de antígeno de los mismos comprenden:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

Otra combinación particular comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

Otra combinación particular comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

Otra combinación particular comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

Otra combinación particular comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

En otro aspecto de esta descripción, se proporcionan conjugados anticuerpo-molécula asociada que comprenden anticuerpos o porciones de fijación de antígeno de los mismos, que compiten para fijación a B7-H4 con cualquiera de los anticuerpos mencionados anteriormente.

Los anticuerpos de esta descripción pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud total, por ejemplo de un isotipo IgG1, IgG2 o IgG4. Como alternativa, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpo, tales como fragmentos Fab, Fab' o Fab'2, o anticuerpos monocatenarios (v.g., scFv).

Esta descripción proporciona también un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo de esta descripción o porción de fijación de antígeno del mismo, enlazado a un agente terapéutico, tal como una citotoxina o un isótopo radiactivo. En una realización particularmente preferida, la invención proporciona un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo de esta descripción, o una porción de fijación de antígeno del mismo, enlazado(a) al compuesto "Toxina A" (*v.g.*, por un enlace tiol). Por ejemplo, en diversas realizaciones, la invención proporciona los conjugados anticuerpo-molécula asociada preferidos siguientes:

(i) un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(b) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;

(c) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

(d) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una

región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; o

(e) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10;

donde el anticuerpo o porción de fijación de antígeno del mismo está enlazado a una toxina, tal como Toxina A, que se expone en detalle en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 60/882461, que se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad;

(ii) un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 11;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 16;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 21;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 26;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 31; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 36; o

un anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 12;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 17;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 22;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 27;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 32; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 37; o

un anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 13;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 18;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 23;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 28;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 33; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 38; o

un anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 14;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 19;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 24;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 29;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 34; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 39; o un anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 15;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 20;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 25;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 30;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 35; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 40;

enlazada a una toxina, tal como Toxina A; y

(iii) un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, que se fija al mismo epítope que es reconocido

por (v.g., compite cruzadamente para fijación de B7-H4 humana con) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(b) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;

(c) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

(d) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; o

(e) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10;

en donde el anticuerpo o porción de fijación de antígeno del mismo está basado a una toxina, tal como Toxina A.

Esta descripción proporciona también una molécula biespecífica que comprende un anticuerpo o porción de fijación de antígeno del mismo, de esta descripción, enlazado a un segundo resto funcional que tiene una especificidad de fijación distinta a dicho anticuerpo o porción de fijación de antígeno del mismo.

Se proporcionan también composiciones que comprenden un anticuerpo o porción de fijación de antígeno del mismo o conjugado anticuerpo-molécula asociada o molécula biespecífica de esta descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos o porciones de fijación de antígeno de los mismos, de esta descripción, están abarcadas también por esta descripción, así como vectores de expresión que comprenden tales ácidos nucleicos, células hospedadoras que comprenden tales vectores de expresión y métodos para producir anticuerpos anti-B7-H4 utilizando tales células hospedadoras. Además, esta descripción proporciona un ratón transgénico que comprende transgenes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana, en donde el ratón expresa un anticuerpo de esta descripción, así como hibridomas preparados a partir de dicho ratón, en donde el hibridoma produce el anticuerpo de esta descripción.

La presente descripción proporciona también conjugados anticuerpo-molécula asociada anti-B7-H4 aislados que se

fijan específicamente a B7-H4 con afinidad alta, particularmente aquéllos que comprenden anticuerpos monoclonales humanos. Algunos de estos conjugados anticuerpo-molécula asociada son capaces de internalizarse en células que expresan B7-H4 y son capaces de mediar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Esta descripción proporciona también métodos para tratamiento de cánceres, tales como cánceres de mama y de ovario, utilizando un conjugado anticuerpo-molécula asociada anti-B7-H4 descrito en esta memoria.

Se proporcionan también composiciones que comprenden un anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, conjugado a una molécula asociada de esta descripción. Moléculas asociadas que pueden conjugarse ventajosamente a un anticuerpo en un conjugado anticuerpo-molécula asociada como se describe en esta memoria incluyen, pero sin carácter limitante, moléculas tales como fármacos, toxinas, moléculas indicadoras (v.g., radioisótopos), proteínas y agentes terapéuticos. Se describen también en esta memoria composiciones que comprenden conjugados anticuerpo-molécula asociada y vehículos farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto, tales conjugados anticuerpo-molécula asociada se conjugan por la vía de enlazadores químicos. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador peptidilo, y se representa en esta memoria como $(L^4)_p$-F-$(L^1)_m$. Otros enlazadores incluyen enlazadores hidrazina y disulfuro, y se representan en esta memoria como $(L^4)_p$-H-

$(L^1)_m$ o $(L^4)_p$-J-$(L^1)_m$, respectivamente. Además de los enlazadores que se fijan al compuesto asociado, la presente invención proporciona también ramas enlazadoras escindibles que son apropiadas para fijación esencialmente a cualquier especie molecular.

En otro aspecto adicional, esta descripción proporciona un método de tratamiento o prevención de una enfermedad caracterizada por crecimiento de células tumorales que expresan B7-H4, que comprende administrar a un sujeto un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo humano anti-B7-H4 de la presente descripción en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad. La enfermedad puede ser un cáncer, tal como un cáncer carcinoma de células mamarias, o un cáncer de ovario.

En otro aspecto adicional, esta descripción proporciona un método de tratamiento de un trastorno autoinmune, que comprende administrar a un sujeto un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo humano anti-B7-H4 de la presente descripción en una cantidad eficaz para tratar el trastorno autoinmune.

Otras características y ventajas de la presente descripción serán evidentes a partir de la descripción detallada que sigue y ejemplos que no deben interpretarse como limitantes. Los contenidos de todas las referencias, entradas en Genbank, Patentes y Solicitudes de Patente

publicadas citadas a lo largo de esta Solicitud se incorporan expresamente en esta memoria por referencia.

Breve Descripción de los Dibujos

La Figura 1A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 41) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 1G11. Se han delineado las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 11), CDR2 (SEQ ID NO: 16) y CDR3 (SEQ ID NO: 21), y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 1B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 46) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 1G11. Se han delineado las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 26), CDR2 (SEQ ID NO: 31) y CDR3 (SEQ ID NO: 36), y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 2A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 42) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2A7. Se han delineado las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 12), CDR2 (SEQ ID NO: 17) y CDR3 (SEQ ID NO: 22), y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D, y J.

La Figura 2B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 47) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 2A7. Se han delineado las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 27), CDR2 (SEQ ID NO: 32) y CDR3 (SEQ ID NO: 37), y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 3A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 43) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 2F9. Se han delineado las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 13), CDR2 (SEQ ID NO: 18) y CDR3 (SEQ ID NO: 23), y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 3B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 48) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 2F9. Se han delineado las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 28), CDR2 (SEQ ID NO: 33) y CDR3 (SEQ ID NO: 38), y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 4A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 44) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 12E1. Se han delineado las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 14), CDR2 (SEQ ID NO: 19) y CDR3 (SEQ ID NO:

24), y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 4B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 49) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 12E1. Se han delineado las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 29), CDR2 (SEQ ID NO: 34) y CDR3 (SEQ ID NO: 39), y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 5A muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 45) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano 13D12. Se han delineado las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 15), CDR2 (SEQ ID NO: 20) y CDR3 (SEQ ID NO: 25), y se indican las derivaciones de la línea germinal V, D y J.

La Figura 5B muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 50) y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano 13D12. Se han delineado las regiones CDR1 (SEQ ID NO: 30), CDR2 (SEQ ID NO: 35) y CDR3 (SEQ ID NO: 40), y se indican las derivaciones de la línea germinal V y J.

La Figura 6 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de

1G11 y 13D12 con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal humana V_H 4-34 (SEQ ID NO: 51).

La Figura 7 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 2A7 y 2F9 con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal humana V_H 3-53 (SEQ ID NO: 52).

La Figura 8 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 12E1 con la secuencia de aminoácidos combinada de la línea germinal humana V_H 3-9/D3-10/JH6b (SEQ ID NO: 53).

La Figura 9 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 1G11, 2A7, 2F9 y 13D12 con la secuencia de aminoácidos de la línea germinal humana V_K A27 (SEQ ID NO: 54).

La Figura 10 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 12E1 con la secuencia de aminoácidos combinada de la línea germinal humana V_K L6/JK1(SEQ ID NO: 55).

Las Figuras 11A y 11B muestran los resultados de experimentos ELISA que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos contra O8E humana se fijan específicamente a O8E. La Figura 11A muestra resultados de una placa ELISA recubierta con anticuerpos humanos anti-O8E seguido por la adición de proteína O8E purificada y

detección con antisueros de conejo anti-O8E. La Figura 11B muestra los resultados de una placa ELISA recubierta con anti-Fc de ratón seguido por anti-C9 monoclonal (0,6 µg/ml), y titulada luego con proteína Penta-O8E como se indica, y seguido por anticuerpos humanos anti-O8E a 1 µg/ml.

La Figura 12 muestra los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran que el anticuerpo monoclonal humano anti-O8E 2A7 se fija a las células CHO transfectadas con O8E.

La Figura 13 muestra los resultados de experimentos de citometría de flujo que demuestran la expresión de O8E en células de carcinoma de mama SKBR3 así como células SKOV3 y HEK transfectadas con O8E.

La Figura 14 muestra los resultados de experimentos de internalización Hum-Zap que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos contra O8E humana pueden internalizarse en células CHO O8E$^+$.

La Figura 15 muestra los resultados de experimentos de internalización Hum-Zap que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos contra O8E humana pueden internalizarse en células SKBR3 O8E$^+$.

La Figura 16 muestra los resultados de experimentos de mapeado de epítopes con diversos anticuerpos monoclonales humanos anti-O8E que incluyen 1G11, 2A7, 2F9 y 13D12.

La Figura 17 muestra los resultados de ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos anti-O8E destruyen la línea de células de cáncer de mama humano SKBR3 de una manera dependiente de ADCC.

La Figura 18 muestra los resultados de ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos anti-O8E destruyen las células SKOV3 transfectadas con O8E de una manera dependiente de ADCC.

La Figura 19 muestra los resultados de ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) que demuestran que los anticuerpos monoclonales humanos anti-O8E destruyen la línea de células de cáncer de mama SKBR3 de una manera dependiente de la concentración y de la ADCC.

La Figura 20 muestra los resultados de estudios *in vivo* de ratones SCID que muestran la inhibición del crecimiento tumoral de tumores HEK-B7-H4 por los anticuerpos anti-O8E.

La Figura 21 presenta un gráfico que muestra los resultados de un modelo de aloinjerto de ratón HEK293-B7-H4 *in vivo*, que presenta el volumen mediano de tumor en ratones

tratados con vehículo solo, anticuerpo desnudo, o conjugados anticuerpo-molécula asociada a diversas concentraciones.

La Figura 22 presenta un gráfico que muestra los resultados de un modelo de aloinjerto de ratón HEK293-B7-H4 *in vivo*, que presenta el cambio mediano de peso corporal en ratones tratados con vehículo solo, anticuerpo desnudo, o conjugados anticuerpo-molécula asociada a diversas concentraciones.

Descripción Detallada

La presente descripción hace referencia a conjugados anticuerpo-molécula asociada que comprenden anticuerpos monoclonales, particularmente anticuerpos monoclonales de secuencia humana, que se fijan específicamente a B7-H4 (conocidos también como 08E, B7S1 y B7x) con afinidad alta. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de esta descripción se derivan de secuencias de la línea germinal de cadena pesada y ligera particulares y/o comprenden características estructurales particulares tales como regiones CDR que comprenden secuencias particulares de aminoácidos. Esta descripción proporciona anticuerpos aislados, métodos de fabricación de tales anticuerpos, conjugados anticuerpo-molécula asociada y moléculas biespecíficas que comprenden tales anticuerpos, así como composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, conjugados anticuerpo-molécula asociada, o moléculas biespecíficas de esta descripción. Esta descripción se

refiere también a métodos de utilización de los conjugados anticuerpo-molécula asociada, tales como la detección de B7-H4, así como el tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión de B7-H4, tales como el cáncer. De acuerdo con ello, esta descripción proporciona también métodos de utilización de los conjugados anticuerpo-molécula asociada anti-B7-H4 de esta descripción para tratar diversos cánceres, por ejemplo, en el tratamiento de carcinomas celulares de mama, cánceres de mama metastásicos, carcinomas de células de ovario, cánceres metastásicos de ovario y carcinomas de células renales.

Con objeto de que la presente descripción pueda comprenderse más fácilmente, se definen en primer lugar ciertos términos. Definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

Los términos "B7-H4", "O8E", "B7x" y "B7S1" se utilizan en esta memoria intercambiablemente e incluyen variantes, isoformas, homólogos, ortólogos y parálogos de B7-H4 humana. Por ejemplo, anticuerpos específicos para B7-H4 pueden reaccionar cruzadamente en ciertos casos con B7-H4 de especies distintas de la humana. En otras realizaciones, los anticuerpos específicos para B7-H4 humana pueden ser completamente específicos para B7-H4 humana y pueden no exhibir especies u otros tipos de reactividad cruzada. El término "B7-H4 humana" hace referencia a la secuencia humana de B7-H4, tal como la secuencia completa de aminoácidos de B7-H4 humana que tiene el número de acceso a

Genbank NP_078902 (SEQ ID NO: 56). B7-H4 se conoce también en la técnica como, por ejemplo, BL-CAM, B3, Leu-14 y Lyb-8. La secuencia humana B7-H4 puede diferir de la B7-H4 humana de SEQ ID NO: 56 por tener, por ejemplo, mutaciones conservadas o mutaciones en regiones no conservadas y la B7-H4 tiene sustancialmente la misma función biológica que la B7-H4 humana de SEQ ID NO: 56. Por ejemplo, una función biológica de B7-H4 humana estriba en tener un epítope en el dominio extracelular de B7-H4 que es fijado específicamente por un anticuerpo de la presente descripción o una función biológica de B7-H4 humana incluye, por ejemplo, la inhibición de la proliferación de las células T, inhibición de la producción de citoquinas, inhibición de la producción del ciclo celular, o fijación a receptores de células T.

Una secuencia de B7-H4 humana particular tendrá generalmente al menos un 90% de identidad en secuencia de aminoácidos con la B7-H4 humana de SEQ ID NO: 56, y contiene residuos de aminoácidos que identifican la secuencia de aminoácidos como secuencia humana cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de B7-H4 de otras especies (v.g., murina). En ciertos casos, una B7-H4 humana puede tener una identidad de al menos 95%, o incluso al menos 96%, 97%, 98%, ó 99% con la secuencia de aminoácidos de B7-H4 de SEQ ID NO: 56. En ciertas realizaciones, una secuencia B7-H4 humana exhibirá no más de 10 diferencias de aminoácidos respecto a la B7-H4 de SEQ ID NO: 56. En ciertas realizaciones, la B7-H4 humana puede exhibir no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2, ó 1 diferencias de

aminoácidos respecto de la B7-H4 de SEQ ID NO: 56. El porcentaje de identidad puede determinarse como se describe en esta memoria.

El término "respuesta inmunitaria" hace referencia a la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígeno, células fagocíticas, granulocitos y macromoléculas solubles producidas por las células anteriores o por el hígado (con inclusión de anticuerpos, citoquinas y complemento) que da como resultado el deterioro selectivo, la destrucción o la eliminación del cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Un "camino de transducción de señales" hace referencia a la relación bioquímica entre una diversidad de moléculas de transducción de señales que juegan un papel en la transmisión de una señal desde una porción de una célula a otra porción de una célula. Como se utiliza en esta memoria, la expresión "receptor de la superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de dicha señal a través de la membrana plasmática de una célula. Un ejemplo de un "receptor de la superficie celular" de la presente descripción es el receptor B7-H4.

El término "anticuerpo" como se hace referencia al mismo en esta memoria, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de fijación de antígeno (*es decir*, "porción de fijación de antígeno") o cadenas simples del mismo. Un "anticuerpo" hace referencia a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de fijación de antígeno de las mismas. Cada cadena pesada está constituida por una región variable de la cadena pesada (abreviada en esta memoria como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está constituida por tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Cada cadena ligera está constituida por una región variable de la cadena ligera (abreviada en esta memoria como V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está constituida por un solo dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse ulteriormente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada V_H y V_L se compone de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el término amino al término carboxi en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de fijación que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la fijación de la inmunoglobulina a tejidos o factores hospedadores, con inclusión de diversas células del sistema

inmunitario (*v.g.*, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

El término "porción de fijación de antígeno" de un anticuerpo (o "porción de anticuerpo"), como se utiliza en esta memoria, hace referencia a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para fijarse específicamente a un antígeno (v.g., B7-H4). Se ha demostrado que la función de fijación de antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud total. Ejemplos de fragmentos de fijación abarcados dentro del término "porción de fijación de antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente constituido por los dominios V_L, V_H, C_L y C_H1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fab', que es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra (véase, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY (Paul compil., 3.ª edición, 1993); (iv) un fragmento Fd constituido por los dominios V_H y C_H1; (v) un fragmento Fv constituido por los dominios V_L y V_H de una sola rama de un anticuerpo, (vi) un fragmento dAb (Ward *et al.* (1989) *Nature* 341:544-546), que está constituido por un dominio V_H; (vii) una región aislada determinante de la complementariedad (CDR); y (viii) un nanocuerpo, una región variable de la cadena pesada que contiene un dominio variable simple y dos dominios constantes. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, son codificados por

genes separados, pueden estar unidos, fijando métodos recombinantes, por un enlazador sintético que permite que los mismos se produzcan como una sola cadena proteínica en la cual las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); *véase, v.g.* Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Debe entenderse también que tales anticuerpos monocatenarios están abarcados dentro del término "porción de fijación de antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, y los fragmentos se someten a cribado respecto a utilidad del mismo modo que ocurre con los anticuerpos intactos.

Debe entenderse que un "anticuerpo aislado", como se utiliza en esta memoria, hace referencia a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tengan especificidades antigénicas diferentes (v.g., un anticuerpo aislado que fija específicamente B7-H4 está sustancialmente exento de anticuerpos que fijan específicamente antígenos distintos de B7-H4). Un anticuerpo aislado que fija específicamente B7-H4 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas B7-H4 y otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otros materiales celulares y/o productos químicos.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal", tal como se utilizan en esta memoria, hacen referencia a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular simple. Una composición de anticuerpo monoclonal exhibe una especificidad de fijación simple y afinidad para un epítope particular. El término "anticuerpo humano" o "anticuerpo de secuencia humana", como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que incluye anticuerpos que tienen regiones variables en las cuales tanto las regiones de entramado como las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Adicionalmente, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante se deriva también de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir modificaciones ulteriores, que incluyen modificaciones naturales o sintéticas. Los anticuerpos humanos de esta descripción pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (v.g., mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria u orientada in vitro o por mutación somática in vivo). Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se utiliza en esta memoria, no pretende incluir anticuerpos en los cuales se han insertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias de entramado humanas.

El término "anticuerpo monoclonal humano", que puede incluir el término "secuencia" después de "humano", hace

referencia a anticuerpos que exhiben una especificidad de fijación simple que tienen regiones variables en las cuales tanto las regiones de entramado como las regiones CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal transgénico no humano, v.g., un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo humano recombinante", como se utiliza en esta memoria, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (v.g., un ratón), que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humanos o un hibridoma preparado a partir de ellos (descrito con mayor detalle más adelante), (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo humano v.g., a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una genoteca recombinante combinatoria de anticuerpos humanos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualesquiera otros medios que impliquen remodelación de secuencias génicas humanas de inmunoglobulina a otras secuencias de DNA. Tales anticuerpos recombinantes humanos tienen regiones variables en las cuales las regiones de entramado y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana.

En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis in vitro (o bien, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática in vivo) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien se derivan de y son afines a las secuencias de la línea germinal humana V_H y V_L, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos in vivo.

Como se utiliza en esta memoria, "isotipo" hace referencia a la clase de anticuerpos (v.g., IgM o IgG1) que está codificada por los genes de la región constante de la cadena pesada. Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se utilizan intercambiablemente en esta memoria con el término "un anticuerpo que se fija específicamente a un antígeno".

La expresión "derivados de anticuerpos humanos" hace referencia a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, v.g., un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo. El término "anticuerpo humanizado" tiene por objeto hacer referencia a anticuerpos en los cuales se han injertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias de entramado humanas. Modificaciones adicionales de las

regiones de entramado pueden hacerse dentro de las secuencias de entramado humanas.

El término "anticuerpo quimérico" tiene por objeto hacer referencia a anticuerpos en los cuales las secuencias de la región variable se derivan de una especie y las secuencias de la región constante se derivan de otra especie, tal como un anticuerpo en el cual las secuencias de la región variable se derivan de un anticuerpo de ratón y las secuencias de la región constante se derivan de un anticuerpo humano.

El término "mimético de anticuerpo" debe entenderse que hace referencia a moléculas capaces de mimetizar la capacidad de un anticuerpo para fijarse a un antígeno, pero que no están limitadas a estructuras de anticuerpos nativas. Ejemplos de tales miméticos de anticuerpos incluyen, pero sin carácter limitante, Afficuerpos, DARPins, Anticalinas, Avímeros, y Versacuerpos, todos los cuales emplean estructuras de fijación que, si bien mimetizan la fijación de anticuerpos tradicional, están generadas por y funcionan por mecanismos distintos.

Como se utiliza en esta memoria, el término "molécula asociada" hace referencia a la entidad que se conjuga con un anticuerpo en un conjugado anticuerpo-molécula asociada. Ejemplos de moléculas asociadas incluyen fármacos, toxinas, moléculas marcadoras (con inclusión de, pero sin carácter limitante, marcadores peptídicos y marcadores de moléculas

pequeñas tales como marcadores de fluorocromo, así como marcadores de átomos simples tales como radioisótopos), proteínas y agentes terapéuticos.

Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que un anticuerpo que "se fija específicamente a B7-H4 humana" hace referencia a un anticuerpo que se fija a B7-H4 humana con un KD de 1×10^{-7} o menos, más típicamente 5×10^{-8} M o menos, más típicamente 3×10^{-8} M o menos, más típicamente 1×10^{-8} M o menos, y más típicamente aún 5×10^{-9} M o menos.

La expresión "no se fija sustancialmente" a una proteína o células, como se utiliza en esta memoria, significa que no se fija o no se fija con afinidad alta a la proteína o las células, es decir se fija a la proteína o las células con un K_D de 1×10^{-6} M o más, más preferiblemente 1×10^{-5} M o más, más preferiblemente 1×10^{-4} M o más, más preferiblemente 1×10^{-3} M o más, y más preferiblemente aún 1×10^{-2} M o más.

El término "K_{asoc}" o "K_a", como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto hacer referencia a la tasa de asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno, mientras que el término K_{dis} o K_d, como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto hacer referencia a la tasa de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. El término "K_D", como se utiliza en esta memoria, tiene por objeto hacer referencia a la constante de disociación, que

se obtiene a partir de la relación de K_d a K_a (es decir, K_d/K_a) y se expresa como concentración molar (M). Valores K_D para anticuerpos pueden determinarse utilizando métodos bien establecidos en la técnica. Un método preferido para determinar el K_D de un anticuerpo es por la utilización de la resonancia superficial del plasmón, utilizando preferiblemente un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

Como se utiliza en esta memoria, el término "afinidad alta" para un anticuerpo IgG hace referencia a un anticuerpo que tiene un K_D de 1 x 10^{-7} M o menos, más preferiblemente 5 x 10^{-8} M o menos, aún más preferiblemente 1 x 10^{-8} M o menos, todavía más preferiblemente 5 x 10^{9} M o menos y aún más preferiblemente 1 x 10^{-9} M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, la fijación con "afinidad alta" puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, la fijación con "afinidad alta" para un isotipo IgM hace referencia a un anticuerpo que tiene un K_D de 10^{-6} M o menos, más preferiblemente 10^{-7} M o menos, y aún más preferiblemente 10^{-8} M o menos.

Como se utiliza en esta memoria, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, v.g., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

El símbolo "-", tanto si se utiliza como enlace como si se presenta perpendicularmente a un enlace, indica el punto en el cual el resto presentado está fijado al resto de la molécula, soporte sólido, etc.

El término "alquilo" en sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, a no ser que se indique otra cosa, una cadena lineal o ramificada, o un radical hidrocarbonado cíclico, o una combinación de los mismos, que puede ser totalmente saturado, mono o poliinsaturado y puede incluir radicales di y multivalentes, que tienen el número de átomos de carbono designado (es decir, C_1-C_{10} significa 1 a 10 carbonos). Ejemplos de radicales hidrocarbonados saturados incluyen, pero sin carácter limitante, grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, ciclohexilo, (ciclohexil)metilo, ciclopropilmetilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y análogos. Un grupo alquilo insaturado es uno que tiene uno o más enlaces dobles o enlaces triples. Ejemplos de grupos alquilo insaturados incluyen, pero sin carácter limitante, vinilo, 2-propenilo, crotilo, 2-isopentilo, 2-(butadienilo), 2,4-pentadienilo, 3-(1,4-pentadienilo), etinilo, 1- y 3-propinilo, 3-butinilo, y sus homólogos e isómeros superiores. Debe entenderse también que el término "alquilo", a no ser que se indique otra cosa, incluye aquellos derivados de alquilo definidos con mayor detalle más adelante, tales como "heteroalquilo". Los grupos

alquilo, que están limitados a grupos hidrocarbonados, se designan "homoalquilo".

El término "alquileno", en sí mismo o como parte de otro sustituyente significa un radical bivalente derivado de un alcano, como se ilustra, pero sin carácter limitante, por -$CH_2CH_2CH_2CH_2$-, e incluye adicionalmente los grupos descritos más adelante como "heteroalquileno". Típicamente, un grupo alquilo (o alquileno) tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, siendo preferidos en la presente invención aquellos grupos que tienen 10 átomos de carbono o menos. Un "alquilo inferior" o "alquileno inferior" es un grupo alquilo o alquileno de cadena más corta, que tiene generalmente 8 átomos de carbono o menos.

El término "heteroalquilo", en sí mismo o en combinación con otro término, significa, a no ser que se indique otra cosa, una cadena lineal o ramificada estable, o un radical hidrocarbonado cíclico, o combinaciones de los mismos, constituido por el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo constituido por O, N, Si, y S, y en donde los átomos de nitrógeno, carbono y azufre pueden estar oxidados opcionalmente y el heteroátomo nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El o los heteroátomos O, N, S y Si pueden estar situados en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo o en la posición en la cual el grupo alquilo se fija al resto de la molécula. Ejemplos incluyen, pero sin carácter limitante,

$-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2,-S(O)-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CH-O-CH_3$, $-Si(CH_3)_3$, $-CH_2-CH=N-OCH_3$, y $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$. Hasta 2 heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo, $-CH_2-NH-OCH_3$ y $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$. Análogamente, el término "heteroalquileno", en sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un radical bivalente derivado de heteroalquilo, como se ilustra, pero sin carácter limitante, por $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ y $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$. En el caso de los grupos heteroalquileno, los heteroátomos pueden ocupar también uno cualquiera de los extremos de la cadena o ambos (v.g. alquilenooxi, alquilenodioxi, alquilenoamino, alquilenodiamino, y análogos). Los términos "heteroalquilo" y "heteroalquileno" abarcan poli(etilenglicol) y sus derivados (véase, por ejemplo, Shearwater Polymers Catalog, 2001). Además, en el caso de los grupos enlazadores alquileno y heteroalquileno, no está implicada orientación alguna del grupo enlazador por la dirección en la cual se describe la fórmula del grupo enlazador. Por ejemplo, la fórmula $-C(O)_2R'-$ representa tanto $-C(O)_2R'-$ como $-R'C(O)_2-$.

El término "inferior" en combinación con los términos "alquilo" o "heteroalquilo" hace referencia a un resto que tiene de 1 a 6 átomos de carbono.

Los términos "alcoxi", "alquilamino", "alquilsulfonilo" y "alquiltio" (o tioalcoxi) se utilizan en su sentido convencional, y hacen referencia a aquellos grupos alquilo

unidos al resto de la molécula por un átomo de oxígeno, un grupo amino, un grupo SO_2 o un átomo de azufre, respectivamente. El término "arilsulfonilo" hace referencia a un grupo arilo unido al resto de la molécula por un grupo SO_2, y el término "sulfhidrilo" hace referencia a un grupo SH.

En general, un "sustituyente acilo" se selecciona también del grupo arriba indicado. Como se utiliza en esta memoria, el término "sustituyente acilo" hace referencia a grupos unidos a, y que saturan la valencia de, un carbono de carbonilo que está unido directa o indirectamente al núcleo policíclico de los compuestos de la presente invención.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", en sí mismos o en combinación con otros términos, representan, a no ser que se indique otra cosa, versiones cíclicas de "alquilo" sustituido o insustituido y "heteroalquilo" sustituido o insustituido, respectivamente. Adicionalmente, en el caso de heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la cual el heterociclo está unido al resto de la molécula. Ejemplos de cicloalquilo incluyen, pero sin carácter limitante, ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y análogos. Ejemplos de heterocicloalquilo incluyen, pero sin carácter limitante, 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo,

2-piperazinilo, y análogos. Opcionalmente, los heteroátomos y átomos de carbono de las estructuras cíclicas están oxidados.

Los términos "halo" o "halógeno" en sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, a no ser que se indique otra cosa, un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo. Adicionalmente, términos tales como "haloalquilo", incluyen monohaloalquilo y polihaloalquilo. Por ejemplo, debe entenderse que el término "halo-alquilo(C_1-C_4)", debe entenderse que incluye, pero sin carácter limitante, trifluorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 4-clorobutilo, 3-bromopropilo, y análogos.

El término "arilo" significa, a no ser que se indique otra cosa, un sustituyente hidrocarbonado poliinsaturado aromático sustituido o insustituido, que puede ser un solo anillo o anillos múltiples (preferiblemente de 1 a 3 anillos) que pueden estar condensados o unidos covalentemente. El término "heteroarilo" hace referencia a grupos arilo (o anillos) que contienen de 1 a 4 heteroátomos seleccionados de N, O, y S, en donde los átomos de nitrógeno, carbono y azufre están opcionalmente oxidados, y el o los átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Un grupo heteroarilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Ejemplos no limitantes de grupos arilo y heteroarilo incluyen fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, 4-bifenilo, 1-pirrolilo, 2-pirrolilo, 3-pirrolilo, 3-

pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo, y 6-quinolilo. Sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillos arilo y heteroarilo arriba indicados se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descrito más adelante. "Arilo" y "heteroarilo" abarcan también sistemas de anillos en los cuales uno o más sistemas de anillos no aromáticos están condensados, o unidos de otro modo, a un sistema de arilo o heteroarilo.

Por brevedad, el término "arilo", cuando se utiliza en combinación con otros términos (*v.g.*, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo) incluye anillos tanto arilo como heteroarilo como se definen arriba. Así, debe entenderse que el término "arilalquilo" incluye aquellos radicales en los cuales un grupo arilo está unido a un grupo alquilo (*v.g.*, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y análogos) con inclusión de aquellos grupos alquilo en los cuales un átomo de carbono (*v.g.*, un grupo metileno) ha sido reemplazado, por ejemplo, con un átomo de oxígeno (*v.g.*, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y análogos).

Cada uno de los términos anteriores (*v.g.*, "alquilo", "heteroalquilo", "arilo" y "heteroarilo" incluye formas tanto sustituidas como insustituidas del radical indicado. Sustituyentes preferidos para cada tipo de radical se proporcionan a continuación.

Sustituyentes para los radicales alquilo y heteroalquilo (con inclusión de aquellos grupos a los que se hace referencia a menudo como alquileno, alquenilo, heteroalquileno, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo, y heterocicloalquenilo) se designan generalmente como "sustituyentes de alquilo" y "sustituyentes de heteroalquilo", respectivamente, y pueden ser uno o más de una diversidad de grupos seleccionados de, pero sin carácter limitante: -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R", -SR', -halógeno, -SiR'R"R"', -OC(O)R', -C(O)R', -CO_2R', -CONR'R", -OC(O)NR'R", -NR"C(O)R', -NR'-C(O)NR"R"', -NR"$C(O)_2$R', -NR-C(NR'R"R'")=NR"", -NR-C(NR'R")=NR'", -S(O)R', -$S(O)_2$R', -$S(O)_2$NR'R", -$NRSO_2$R', -CN y -NO_2 en un número comprendido entre cero y (2m'+1), donde m' es el número total de átomos de carbono en dicho radical. R', R", R"' y R"", cada uno preferiblemente de modo independiente, hacen referencia a grupos hidrógeno, heteroalquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, v.g., arilo sustituido con 1-3 halógenos, alquilo, alcoxi o tioalcoxi sustituido o insustituido, o grupos arilalquilo. Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente al igual que cada uno de los grupos R',

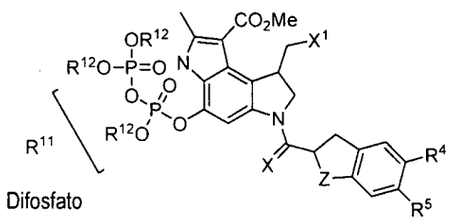
R", R"' y R"" cuando está presente más de uno de estos grupos. Cuando R' y R" están unidos al mismo átomo de nitrógeno, pueden combinarse ambos con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6, ó 7 miembros. Por ejemplo, debe entenderse que -NR'R" incluye, pero sin carácter limitante, 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la exposición anterior de los sustituyentes, una persona con experiencia en la técnica comprenderá que debe entenderse que el término "alquilo" incluye grupos que incluyen átomos de carbono unidos a grupos distintos de grupos hidrógeno, tales como haloalquilo (*v.g.*, $-CF_3$ y $-CH_2CF_3$) y acilo (*v.g.*, $-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$, y análogos).

Análogamente a los sustituyentes descritos para el radical alquilo, se hace referencia generalmente a los sustituyentes de arilo y sustituyentes de heteroarilo como "sustituyentes de arilo" y "sustituyentes de heteroarilo", respectivamente, y son diversos y se seleccionan de, por ejemplo: halógeno, $-OR'$, $=O$, $=NR'$, $=N-OR'$, $-NR'R"$, $-SR'$, -halógeno, $-SiR'R"R"'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)R'$, $-CO_2R'$, $-CONR'R"$, $-OC(O)NR'R"$, $-NR"C(O)R'$, $-NR'-C(O)NR"R"'$, $-NR"C(O)_2R'$, $-NR-C(NR'R")=NR'"$, $-S(O)R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R"$, $-NRSO_2R'$, $-CN$ y $-NO_2$, $-R'$, $-N_3$, $-CH(Ph)_2$, fluoro(C_1-C_4)alcoxi, y fluoro(C_1-C_4)alquilo, en un número que va desde cero hasta el número total de valencias libres en el sistema de anillos aromático; y donde R', R", R"', y R"" se seleccionan preferiblemente de modo independiente de hidrógeno, alquilo (C_1-C_8) y heteroalquilo, arilo

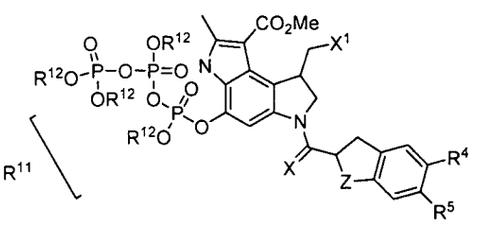
insustituido y heteroarilo, (arilo insustituido)-alquilo (C_1-C_4), y (arilo insustituido)oxi-alquilo (C_1-C_4). Cuando un compuesto de la invención incluye más de un grupo R, por ejemplo, cada uno de los grupos R se selecciona independientemente al igual que los grupos R', R", R"', y R"" cuando está presente más de uno de estos grupos.

Dos de los sustituyentes arilo en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden estar reemplazados opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -T-C(O)-$(CRR')_q$-U-, en donde T y U son independientemente -NR-, -O-, -CRR'- o un enlace simple, y q es un número entero de 0 a 3. Como alternativa, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o hetero-arilo pueden estar reemplazados opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -A-$(CH_2)_r$-B-, en donde A y B son independientemente -CRR'-, -O-, -NR-, -S-, -S(O)-, -$S(O)_2$-, -$S(O)_2$NR' o un enlace simple, y r es un número entero de 1 a 4. Uno de los enlaces simples del nuevo anillo así formado puede estar reemplazado opcionalmente con un enlace doble. Como alternativa, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arilo o heteroarilo pueden estar reemplazados opcionalmente con un sustituyente de la fórmula -$(CRR')_s$-X-$(CR"R"')_d$-, donde s y d son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -$S(O)_2$-, o -$S(O)_2$NR'-. Los sustituyentes R, R', R" y R"' se seleccionan preferiblemente de modo independiente de hidrógeno o alquilo (C_1-C_6) sustituido o insustituido.

Como se utiliza en esta memoria, el término "difosfato" incluye pero sin carácter limitante un éster de ácido fosfórico que contiene dos grupos fosfato. El término "trifosfato" incluye pero sin carácter limitante un éster de ácido fosfórico que contiene tres grupos fosfato. Por ejemplo, fármacos particulares que tienen un difosfato o un trifosfato incluyen:



Difosfato



Trifosfato

Como se utiliza en esta memoria, el término "heteroátomo" incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), azufre (S) y silicio (Si).

El símbolo "R" es una abreviatura general que representa un grupo sustituyente que se selecciona de grupos alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, heteroarilo sustituido o insustituido, y heterociclilo sustituido o insustituido.

Diversos aspectos de la invención se describen con mayor detalle en las subsecciones siguientes.

Anticuerpos anti-B7-H4 que tienen propiedades funcionales particulares

Los anticuerpos de esta descripción se caracterizan por características o propiedades funcionales particulares de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se fijan específicamente a B7-H4 humana, tal como B7-H4 humana expresada en la superficie celular. Preferiblemente, un anticuerpo de esta descripción se fija a B7-H4 humana por afinidad alta, por ejemplo con un K_D de 1 x 10^{-7} M o menos, más preferiblemente con un K_D de 5 x 10^{-8} M o menos y aún más preferiblemente con un K_D de 1 x 10^{-8} M o menos. Un anticuerpo anti-B7-H4 de esta descripción se fija a B7-H4 humana y exhibe preferiblemente una o más de las propiedades siguientes:

(a) se fija a B7-H4 humana con una afinidad de 1 x 10^{-8} M o menos;

(b) es internalizado por las células que expresan B7-H4;

(c) exhibe citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra las células que expresan B7-H4; y

(d) inhibe el crecimiento de células que expresan B7-H4 *in vivo* cuando se conjuga a una citotoxina.

En una realización preferida, el anticuerpo exhibe al menos dos de las propiedades (a), (b), (c), y (d). En una realización más preferida, el anticuerpo exhibe al menos tres de las propiedades (a), (b), (c), y (d). En una realización aún más preferida, el anticuerpo exhibe las cuatro propiedades, (a), (b), (c) y (d). En otra

realización preferida, el anticuerpo se fija a B7-H4 con una afinidad de 5 x 10^{-9} M o menos. En otra realización preferida adicional, el anticuerpo inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan B7-H4 *in vivo* cuando el anticuerpo está conjugado a una citotoxina.

Preferiblemente, un anticuerpo de esta descripción se fija a una proteína B7-H4 con un K_D de 5 x 10^{-8} M o menos, se fija a una proteína B7-H4 con un K_D de 3 x 10^{-8} M o menos, se fija a una proteína B7-H4 con un K_D de 1 x 10^{-8} M o menos, se fija a una proteína B7-H4 con un K_D de 7 x 10^{-9} M o menos, se fija a una proteína B7-H4 con un K_D de 6 x 10^{-9} M o menos o se fija a una proteína B7-H4 con un K_D de 5 x 10^{-9} M o menos. La afinidad de fijación del anticuerpo para B7-H4 puede evaluarse, por ejemplo, por análisis BIACORE estándar.

Ensayos estándar para evaluar la capacidad de fijación de los anticuerpos hacia B7-H4 se conocen en la técnica, incluyendo por ejemplo, ELISAs, transferencias Western, RIAs y análisis por citometría de flujo. Las cinéticas de fijación (v.g., afinidad de fijación) de los anticuerpos pueden evaluarse también por ensayos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo por ELISA, análisis Scatchard y análisis por el sistema Biacore®. Como un ejemplo adicional, los anticuerpos de la presente descripción pueden fijarse a una línea de células tumorales de carcinoma de mama, por ejemplo, la línea de células SKBR3.

Anticuerpos Monoclonales 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12

Los anticuerpos citados como ejemplo de esta descripción incluyen los anticuerpos monoclonales humanos 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12, aislados y caracterizados estructuralmente como se describe en la Solicitud PCT PCT/US2006/061816, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Las secuencias de aminoácidos V_H de 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12 se muestran en SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos V_L de 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12 se muestran en SEQ ID NOs: 6, 7, 8, 9 y 10, respectivamente.

Dado que cada uno de estos anticuerpos puede fijarse a B7-H4, las secuencias V_H y V_L pueden "mezclarse y emparejarse" para crear otras moléculas de fijación anti-B7-H4 de esta descripción. La fijación a B7-H4 de tales anticuerpos "mezclados y emparejados" puede testarse utilizando los ensayos de fijación arriba descritos (v.g., FACS o ELISAs). Preferiblemente, cuando las cadenas V_H y V_L se mezclan y aparean, una secuencia V_H de una pareja V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia V_H estructuralmente similar. De modo análogo, típicamente una secuencia V_L de un par V_H/V_L particular se reemplaza con una secuencia V_L estructuralmente similar. De acuerdo con ello, en un aspecto, esta descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción de fijación de antígeno del mismo que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4 y 5; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 6, 7, 8, 9 y 10; en donde el anticuerpo se fija específicamente a B7-H4, preferiblemente B7-H4 humana.

Combinaciones preferidas de cadenas pesada y ligera incluyen:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6; o

(c) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y

(d) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; o

(e) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y

(f) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; o

(g) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y

(h) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; o

(i) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y

(j) una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

En otro aspecto, esta descripción proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1s, CDR2s y CDR3s de la cadena pesada y la cadena ligera de 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12 o combinaciones de las mismas. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1S de V_H de 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12 se muestran en SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14 y 15, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s V_H de 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12 se muestran en SEQ ID NOs: 16, 17, 18, 19 y 20, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s de V_H de 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12 se muestran en SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24 y 25, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR1s de V_K de 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12 se muestran en SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29 y 30, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR2s de V_K de 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12 se muestran en SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34 y 35, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las CDR3s de V_K de 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12 se muestran en SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39 y 40, respectivamente. Las regiones CDR se delinean utilizando el sistema Kabat (Kabat, E.A. *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª edición, Departamento de Sanidad y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación NIH No. 91-3242).

Dado que cada uno de los anticuerpos humanos designados 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12 pueden fijarse a B7-H4 y que

la especificidad de fijación de antígeno es proporciona fundamentalmente por las regiones CDR1, CDR2 y CDR3, las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H y las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 de V_K pueden "mezclarse y aparearse" (es decir, las CDRs de anticuerpos diferentes pueden mezclarse y aparearse, aunque cada anticuerpo debe contener una CDR1, CDR2 y CDR3 de V_H y una CDR1, CDR2 y CDR3 de V_K) para crear otras moléculas de fijación anti-B7-H4 de esta descripción. La fijación a B7-H4 de tales anticuerpos "mezclados y emparejados" puede testarse utilizando los ensayos de fijación arriba descritos (v.g., FACS, ELISAs, y análisis por el sistema Biacore®). Preferiblemente, cuando se mezclan y aparean secuencias CDR de V_H, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_H particular se reemplaza con una o más secuencias CDR estructuralmente similares. De modo análogo, cuando se mezclan y emparejan secuencias CDR de V_K, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 de una secuencia V_K particular se reemplaza típicamente con una o más secuencias CDR estructuralmente similares. Será fácilmente evidente para el personal con experiencia ordinaria que pueden crearse nuevas secuencias V_H y V_L por sustitución de una o más secuencias de región CDR de V_H y/o V_L con secuencias estructuralmente similares de las secuencias CDR descritas en esta memoria para anticuerpos monoclonales en 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12. De acuerdo con ello, en otro aspecto, esta descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción de fijación de antígeno del mismo que comprende:

(a) una región variable CDR1 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14 y 15;

(b) una región variable CDR2 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 16, 17, 18, 19 y 20;

(c) una región variable CDR3 de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24 y 25;

(d) una región variable CDR1 de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 26, 27, 28 , 29 y 30;

(e) una región variable CDR2 de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34 y 35;

(f) una región variable CDR3 de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39 y 40; en donde el anticuerpo se fija específicamente a B7-H4, preferiblemente B7-H4 humana.

En una realización preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable CDR1 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 11;

(b) una región variable CDR2 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 16;

(c) una región variable CDR3 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 21;

(d) una región variable CDR1 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 26;

(e) una región variable CDR2 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 31; y

(f) una región variable CDR3 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 36.

En otra realización preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable CDR1 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 12;

(b) una región variable CDR2 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 17;

(c) una región variable CDR3 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 22;

(d) una región variable CDR1 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 27;

(e) una región variable CDR2 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 32; y

(f) una región variable CDR3 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 37.

En otra realización preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable CDR1 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 13;

(b) una región variable CDR2 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 18;

(c) una región variable CDR3 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 23;

(d) una región variable CDR1 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 28;

(e) una región variable CDR2 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 33; y

(f) una región variable CDR3 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 38.

En otra realización preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable CDR1 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 14;

(b) una región variable CDR2 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 19;

(c) una región variable CDR3 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 24;

(d) una región variable CDR1 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 29;

(e) una región variable CDR2 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 34; y

(f) una región variable CDR3 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 39.

En otra realización preferida, el anticuerpo comprende:

(a) una región variable CDR1 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 15;

(b) una región variable CDR2 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 20;

(c) una región variable CDR3 de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 25;

(d) una región variable CDR1 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 30;

(e) una región variable CDR2 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 35; y

(f) una región variable CDR3 de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 40.

Es bien conocido en la técnica que el dominio CDR3, independientemente del (de los) dominio(s) CDR1 y/o CDR2, puede determinar por sí solo la especificidad de fijación de un anticuerpo para un antígeno cognado y que pueden generarse predeciblemente múltiples anticuerpos que tienen la misma especificidad de fijación basada en una secuencia CDR3 común. Véase, por ejemplo, Klimka *et al.*, *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000) (que describe la producción de un anticuerpo humanizado anti-CD30 utilizando solamente la CDR3 del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo murino anti-CD30 Ki-4); Beiboer *et al.*, *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000) (que describe anticuerpos recombinantes de glicoproteína-2 epitelial (EGP-2) utilizando únicamente la secuencia CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo parental murino MOC-31 anti-EGP-2); Rader *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998) (que describe un panel de anticuerpos humanizados antiintegrina $\alpha_v\beta_3$ utilizando un dominio CDR3 variable de cadenas pesada y ligera de un anticuerpo murino antiintegrina $\alpha_v\beta_3$ LM609, en donde cada anticuerpo miembro comprende una secuencia distinta fuera del dominio CDR3 y capaz de fijar el mismo epítope que el anticuerpo parental murino con afinidades

tan altas como o mayores que el anticuerpo parental murino); Barbas *et al., J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994) (que describe que el dominio CDR3 aporta la contribución más importante a la fijación de antígeno); Barbas *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995) (que describe el injerto de secuencias CDR3 de cadena pesada de tres Fabs (SI-1, SI-40, y SI-32) contra el DNA placentario humano en la cadena pesada de un toxoide antitétanos Fab reemplazando con ello la CDR3 de la cadena pesada existente y demostrando que el dominio CDR3 por sí solo confería especificad de fijación); Ditzel *et al., J. Immunol* 157:739-749 (1996) (que describe estudios de injerto en los cuales la transferencia de sólo la cadena pesada CDR3 de una LNA3 Fab parental poliespecífica a una cadena pesada de un anticuerpo monoespecífico de fijación del toxoide IgG del tétanos, Fab p313 era suficiente para retener la especificidad de fijación del Fab parental); Berezov *et al., BIAjournal* 8: Scientific Review 8 (2001) (que describe miméticos peptídicos basados en la CDR3 de un anticuerpo monoclonal anti-HER2; Igarashi *et al., J. Biochem (Tokio)* 117:452-7 (1995) (que describe un polipéptido sintético de 12 aminoácidos correspondiente al dominio CDR3 de un anticuerpo antifosfatidilserina); Bourgeois *et al., J. Virol* 72:807-10 (1998) (que demuestra que un péptido simple derivado del dominio CDR3 de la cadena pesada de un anticuerpo contra el virus respiratorio sincitial (RSV) era capaz de neutralizar el virus *in vitro*); Levi *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:4374-8 (1993) (que describe un péptido basado en el dominio CDR3

de la cadena pesada de un anticuerpo anti-VIH murino), Polymenis y Stoller, *J. Immunol.* 152:5218-5329 (1994) (que describe la fijación permisiva de un scFv por injerto de la región CDR3 de la cadena pesada de un anticuerpo de fijación Z-DNA) y Xu y Davis, *Immunity* 13:37-45 (2000) (que describe que la diversidad en CDR3 de la cadena pesada es suficiente para permitir que moléculas de IgM idénticas por lo demás distingan entre una diversidad de antígenos de haptenos y proteínas). Véanse también las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6,951,646; 6,914,128; 6,090,382; 6,818,216; 6,156,313; 6,827,925; 5,833,943; 5,762,905 y 5,760,185, que describen anticuerpos patentados definidos por un solo dominio CDR. Cada una de estas referencias se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad.

De acuerdo con ello, dentro de ciertos aspectos, la presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón o de rata, en donde el anticuerpo monoclonal es capaz de fijarse específicamente a B7-H4. Dentro de algunas realizaciones, tales anticuerpos de inventiva que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera a partir de un anticuerpo no humano (a) son capaces de competir para fijación con; (b) retienen las características funcionales; (c) se fijan al mismo epítope; y/o (d) tienen una afinidad de fijación similar a la del anticuerpo parental no humano correspondiente.

En otros aspectos, la presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera de un primer anticuerpo humano, tal como, por ejemplo, un anticuerpo humano obtenido de un animal no humano, en donde el primer anticuerpo humano es capaz de fijarse específicamente a B7-H4 y en donde el dominio CDR3 del primer anticuerpo humano reemplaza un dominio CDR3 en un anticuerpo humano que carece de especificidad de fijación para B7-H4 a fin de generar un segundo anticuerpo humano que es capaz de fijarse específicamente a B7-H4. En algunas realizaciones, tales anticuerpos de inventiva que comprenden uno o más dominios CDR3 de cadena pesada y/o ligera del primer anticuerpo humano (a) son capaces de competir para fijación con; (b) retienen las características funcionales; (c) se fijan al mismo epítope; y/o (d) tienen una afinidad de fijación similar a la del primer anticuerpo humano parental correspondiente.

Anticuerpos que Tienen Secuencias Particulares de la Línea Germinal

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de esta descripción comprende una región variable de la cadena pesada de un gen particular de inmunoglobulina de cadena pesada de la línea germinal y/o una región variable de la cadena ligera de un gen particular de inmunoglobulina de cadena ligera de la línea germinal.

Por ejemplo, en una realización preferida, esta descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen V_H 4-34 humano, en donde el anticuerpo se fija específicamente a B7-H4. En otra realización preferida, esta descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen V_H 3-53 humano, en donde el anticuerpo se fija específicamente a B7-H4.

En otra realización preferida, esta descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen combinado V_H 3-9/D3-10/JH6b humano, en donde el anticuerpo se fija específicamente a B7-H4.

En otra realización preferida, esta descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen V_K A27 humano, en donde el anticuerpo se fija específicamente a B7-H4.

En otra realización preferida, esta descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una porción de fijación

de antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen V_K L6/JK1 humano, en donde el anticuerpo se fija específicamente a B7-H4.

En otra realización preferida adicional, esta descripción proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o una región de fijación de antígeno del mismo, en donde el anticuerpo:

(a) comprende una región variable de la cadena pesada que es el producto de o se deriva de un gen V_H 4-34 humano, un gen V_H 3-53 humano o un gen V_H 3-9/D3-10/JH6B combinado humano (genes que codifican las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NOs: 51, 52 y 53, respectivamente);

(b) comprende una región variable de la cadena ligera que es el producto de o se deriva de un gen V_K A27 humano o un gen V_K L6/JK1 1 combinado humano (genes que codifican las secuencias de aminoácidos indicadas en SEQ ID NOs: 54 y 55, respectivamente); y

(c) el anticuerpo se fija específicamente a B7-H4, típicamente B7-H4 humana. Ejemplos de anticuerpos que tienen V_H y V_K de V_H 4-34 y V_K A27, respectivamente, son 1G11 y 13D12. Ejemplos de anticuerpos que tienen V_H y V_K de V_H 3-53 y V_K A27, respectivamente, son 2A7 y 2F9. Un ejemplo de un anticuerpo que tiene V_H y V_K de V_H 3-9/D 3-10/JH6b y V_K L6/JK1, respectivamente, es 12E1.

Como se utiliza en esta memoria, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o ligera que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia

particular de línea germinal si las regiones variables del anticuerpo se obtienen de un sistema que utiliza genes de inmunoglobulina de línea germinal humana. Tales sistemas incluyen la inmunización de un ratón transgénico que lleva genes de inmunoglobulina humanos con el antígeno de interés o cribar una colección de genes de inmunoglobulina humana presentada en fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal por comparación de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulinas de la línea germinal humana y selección de la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana que está más próxima en secuencia (es decir, con identidad porcentual máxima) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano que es "el producto de" o "se deriva de" una secuencia particular de inmunoglobulina de la línea germinal humana puede contener diferencias de aminoácidos en comparación con la secuencia de la línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas existentes naturalmente o a la introducción intencional de mutación orientada. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado tiene típicamente al menos un 90% de identidad en secuencia de aminoácidos respecto a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana y contiene residuos de aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como tal cuando se compara con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de la

línea germinal de otra(s) especie(s) (v.g., secuencias de línea germinal murina). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede tener al menos una identidad de 95% o incluso al menos de 96%, 97%, 98% o 99% en secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia particular de la línea germinal humana presentará no más de 10 diferencias de aminoácidos respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede presentar no más de 5 o incluso no más de 4, 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

Anticuerpos Homólogos

En otra realización adicional, un anticuerpo de esta descripción comprende regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden secuencias de aminoácidos que son homólogas a las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos preferidos descritos en esta memoria y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-B7-H4 de esta descripción.

Por ejemplo, esta descripción proporciona un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo monoclonal o porción de fijación de antígeno del mismo, que

comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde:

(a) la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de homología respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, y 5;

(b) la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de homología respecto a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 6, 7, 8, 9 y 10;

(c) el anticuerpo se fija a B7-H4 humana con un KD de 1 x 10^{-7} M o menos;

(d) el anticuerpo se fija a células CHO humanas (sic) transfectadas con B7-H4; y/o

(e) el anticuerpo inhibe el crecimiento del tumor de células tumorales que expresan B7-H4 *in vivo* cuando se conjuga a una citotoxina.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos V_H y/o V_L pueden tener una homología de 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con las secuencias arriba indicadas. Un anticuerpo que tenga regiones V_H y V_L con homología alta (es decir 80% o mayor) respecto a las regiones V_H y V_L de

las secuencias arriba indicadas, puede obtenerse por mutagénesis (v.g. mutagénesis orientada o mutagénesis mediada por PCR) de moléculas de ácido nucleico que codifican SEQ ID NOs: 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50, seguido por sometimiento a test del anticuerpo alterado codificado respecto a función retenida (es decir, las funciones indicadas en (c), (d) y (e) anteriormente), utilizando los ensayos funcionales descritos en esta memoria.

Como se utiliza en esta memoria, el porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir % homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de lagunas y la longitud de cada laguna, que precisa(n) ser introducida(s) para alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden realizarse utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes que se dan más adelante.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.* 4:11-17 (1988)) que ha sido incorporado en el programa ALIGN

(versión 2.0), utilizando una tabla de pesos de residuos PAM120, una penalidad por longitud de laguna de 12 y una penalidad por laguna de 4. Adicionalmente, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) que ha sido incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en http://www.gcg.com), utilizando una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de laguna de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ó 4 y un peso por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

Adicionalmente o como alternativa, las secuencias de las proteínas de la presente descripción pueden utilizarse ulteriormente como "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas a fin de, por ejemplo, identificar secuencias afines. Tales búsquedas pueden realizarse utilizando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990), *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, registro = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de anticuerpos de esta descripción. Para obtener alineaciones con lagunas para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.* (1997), *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, son útiles los parámetros por defecto de los programas respectivos (*v.g.*, XBLAST y NBLAST). Véase www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticuerpos con Modificaciones Conservadoras

En ciertas realizaciones, un anticuerpo de esta descripción comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias CDR comprenden secuencias específicas de aminoácidos basadas en los anticuerpos preferidos descritos en esta memoria (v.g., 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 o 13D12) o modificaciones conservadoras de los mismos y en donde los anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti-B7-H4 de esta descripción.

De acuerdo con ello, esta descripción proporciona un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo monoclonal o porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde:

(a) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24 y 25 y modificaciones conservadoras de las mismas;

(b) la secuencia CDR3 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias de

aminoácidos de SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39 y 40 y modificaciones conservadoras de las mismas;

(c) el anticuerpo se fija a B7-H4 humana con un KD de 1 x 10^{-7} M o menos;

(d) el anticuerpo se fija a células CHO humanas (sic) transfectadas con B7-H4; y/o

(e) el anticuerpo inhibe el crecimiento del tumor de las células tumorales que expresan B7-H4 *in vivo* cuando está conjugado a una citotoxina.

En una realización preferida, la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 16, 17, 18, 19 y 20 y modificaciones conservadoras de las mismas; y la secuencia CDR2 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de amino-ácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34 y 35 y modificaciones conservadoras de las mismas. En otra realización preferida, la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14 y 15 y modificaciones conservadoras de las mismas; y la secuencia CDR1 de la región variable de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29 y 30 y modificaciones conservadoras de las mismas.

En diversas realizaciones, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

Como se utiliza en esta memoria, el término "modificaciones de secuencia conservadoras" tiene por objeto hacer referencia a modificaciones de aminoácidos que no afectan o alteran significativamente las características de fijación del anticuerpo que contiene la secuencia de aminoácidos. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Las modificaciones pueden introducirse en un anticuerpo de esta descripción por métodos estándar conocidos en la técnica, tales como mutagénesis orientada y mutagénesis mediada por PCR. Sustituciones conservadoras de aminoácidos son aquéllas en las cuales el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (v.g., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (v.g., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (v.g., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales apolares (v.g., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas en posición beta (v.g., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales

aromáticas (v.g., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de esta descripción puede(n) reemplazarse con otros residuos de aminoácidos de la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado puede testarse en cuanto a función retenida.

Anticuerpos que se Fijan al Mismo Epítope que los Anticuerpos Anti-B7-H4 de esta Descripción

En otra realización, esta descripción proporciona anticuerpos que se fijan al mismo epítope en B7-H4 reconocido por cualquiera de los anticuerpos monoclonales B7-H4 de esta descripción (es decir, anticuerpos que tienen la capacidad para competir cruzadamente respecto a la fijación a B7-H4 con cualquiera de los anticuerpos monoclonales de esta descripción). En realizaciones preferidas, el anticuerpo de referencia para estudios de competición cruzada puede ser el anticuerpo monoclonal 1G11 (que tiene secuencias V_H y V_L como se muestra en SEQ ID NOs: 1 y 6, respectivamente) o el anticuerpo monoclonal 2A7 (que tiene secuencias V_H y V_L como se muestra en SEQ ID NOs: 2 y 7, respectivamente) o el anticuerpo monoclonal 2F9 (que tiene secuencias V_H y V_L como se muestra en SEQ ID NOs: 3 y 8, respectivamente) o el anticuerpo monoclonal 12E1 (que tiene secuencias V_H y V_L como se muestra en SEQ ID NOs: 4 y 9, respectivamente) o el anticuerpo monoclonal 13D12 (que tiene secuencias V_H y V_L como se muestra en SEQ ID NOs: 5 y 10, respectivamente). Tales anticuerpos de competición cruzada pueden identificarse basándose en su

capacidad para competir de manera cruzada con 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 o 13D12 en ensayos estándar de fijación de B7-H4. Por ejemplo, pueden utilizarse el análisis por el sistema BIAcore®, ensayos ELISA o citometría de flujo para demostrar la competencia cruzada con los anticuerpos de la presente descripción. La capacidad de un anticuerpo de test para inhibir la fijación de, por ejemplo, 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 o 13D12 a B7-H4 humana demuestra que el anticuerpo de test puede competir con 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 o 13D12 respecto a la fijación a B7-H4 humana y se fija por tanto al mismo epítope en B7-H4 humana que 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 o 13D12. En una realización preferida, el anticuerpo que se fija al mismo epítope en B7-H4 humana que es reconocido por 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 o 13D12 es un anticuerpo humano monoclonal.

Anticuerpos Elaborados por Ingeniería Genética y Modificados

Un anticuerpo de esta descripción puede prepararse adicionalmente utilizando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias V_H y/o V_L descritas en esta memoria como material de partida para elaborar por ingeniería un anticuerpo modificado, anticuerpo modificado que puede tener propiedades alteradas respecto al anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede elaborarse por ingeniería genética por modificación de uno o más residuos dentro de una o más regiones variables (a saber V_H y/o V_L), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones de entramado. Adicionalmente o como

alternativa, un anticuerpo puede elaborarse por ingeniería genética por modificación de residuos dentro de la o las regiones constantes, por ejemplo para alterar la o las funciones efectoras del anticuerpo. Un tipo de elaboración por ingeniería genética de la región variable que puede realizarse es el injerto de CDR.

Los anticuerpos interaccionan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) de las cadenas pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDRs son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias que quedan fuera de las CDRs. Dado que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que mimeticen las propiedades de anticuerpos específicos existentes naturalmente por construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR procedentes del anticuerpo específico existente naturalmente injertado en secuencias de entramado de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes. (Véase, *v.g.*, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. See. U.S.A.* 86:10029-10033; la Patente de los Estados Unidos No. 5,225,539 otorgada a Winter, y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 otorgadas a Queen *et al*).

De acuerdo con ello, otra realización de esta descripción hace referencia a un anticuerpo monoclonal aislado o porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14 y 15; SEQ ID NOs: 16, 17, 18, 19 y 20; y SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24 y 25; respectivamente y una región variable de la cadena ligera que comprende secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29 y 30; SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34 y 35; y SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39 y 40; respectivamente. Así pues, tales anticuerpos contienen las secuencias CDR V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 o 13D12 pero pueden contener secuencias de entramado diferentes de estos anticuerpos.

Tales secuencias de entramado pueden obtenerse a partir de bases de datos de DNA públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Por ejemplo, secuencias de DNA de la línea germinal para genes de las regiones variables de cadena pesada y ligera humanas pueden encontrarse en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBase" (disponible de Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como en Kabat, E.A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª edición,

Departamento de Sanidad y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación NIH No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox, J. P. L. *et al.* (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; todos cuyos contenidos se incorporan expresamente en esta memoria por referencia. Como otro ejemplo, las secuencias de DNA de la línea germinal para genes de la región variable de las cadenas pesada y ligera humanas pueden encontrarse en la base de datos Genbank. Por ejemplo, las secuencias de la línea germinal de la cadena pesada siguientes encontradas en el ratón HCo7 HuMAb están disponibles en los números de acceso a Genbank que se indican a continuación: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 3-33 (NG_0010109 y NT_024637) y 3-7 (NG_0010109 y NT_024637). Como otro ejemplo, las secuencias de la línea germinal de la cadena pesada siguientes encontradas en el ratón HCo12 HuMAb están disponibles en los números de acceso a Genbank que se indican a continuación: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 y BC070333), 5-51 (NG_0010109 y NT_024637), 4-34 (NG_0010109 y NT_024637), 3-30.3 (CAJ556644) y (AJ406678). Otra fuente adicional de secuencias de la línea germinal humana de las cadenas pesada y ligera es la base de datos de genes de inmunoglobulina humana disponibles de IMGT (http://imgt.cines.fr).

Las secuencias de anticuerpos proteínicos se comparan contra una base de datos recopiladas de secuencias de proteínas utilizando uno de los métodos de búsqueda de similitud de secuencias denominado el Gapped BLAST (Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402), que es bien conocido por los expertos en la técnica. BLAST es el algoritmo heurístico en el cual una alineación estadísticamente significativa entre la secuencia de anticuerpo y la secuencia de la base de datos es probable que contenga pares de segmentos de alto registro (HSP) de palabras alineadas. Los pares de segmentos cuyos registros no pueden mejorarse por extensión o recorte se conocen como un *hit* (acierto). Resumidamente, las secuencias de nucleótidos de origen VBASE (*http.//vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php*) se traducen y se retiene la región entre las regiones de entramado FR1 a FR3 inclusive. Las secuencias de la base de datos tienen una longitud media de 98 residuos. Las secuencias duplicadas que son coincidencias exactas en toda la longitud de la proteína se apartan. Una búsqueda BLAST para proteínas utilizando el programa blastp con parámetros estándar por defecto excepto el filtro de baja complejidad, que está desconectado, y la matriz de sustitución de BLOSUM62, filtra para los 5 aciertos principales que producen coincidencias de secuencia. Las secuencias de nucleótidos se traducen en la totalidad de los seis marcos y el marco que carece de codones de parada en el segmento coincidente de la secuencia de la base de datos se considera el acierto potencial. Esto se confirma a su vez utilizando el programa

Las secuencias de anticuerpos proteínicos se comparan contra una base de datos recopiladas de secuencias de proteínas utilizando uno de los métodos de búsqueda de similitud de secuencias denominado el Gapped BLAST (Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402), que es bien conocido por los expertos en la técnica. BLAST es el algoritmo heurístico en el cual una alineación estadísticamente significativa entre la secuencia de anticuerpo y la secuencia de la base de datos es probable que contenga pares de segmentos de alto registro (HSP) de palabras alineadas. Los pares de segmentos cuyos registros no pueden mejorarse por extensión o recorte se conocen como un *hit* (acierto). Resumidamente, las secuencias de nucleótidos de origen VBASE (*http.//vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php*) se traducen y se retiene la región entre las regiones de entramado FR1 a FR3 inclusive. Las secuencias de la base de datos tienen una longitud media de 98 residuos. Las secuencias duplicadas que son coincidencias exactas en toda la longitud de la proteína se apartan. Una búsqueda BLAST para proteínas utilizando el programa blastp con parámetros estándar por defecto excepto el filtro de baja complejidad, que está desconectado, y la matriz de sustitución de BLOSUM62, filtra para los 5 aciertos principales que producen coincidencias de secuencia. Las secuencias de nucleótidos se traducen en la totalidad de los seis marcos y el marco que carece de codones de parada en el segmento coincidente de la secuencia de la base de datos se considera el acierto potencial. Esto se confirma a su vez utilizando el programa

tblastx de BLAST, que traduce la secuencia de anticuerpos en la totalidad de los 6 marcos y compara dichas traducciones con respecto a las secuencias de nucleótidos VBASE traducidas dinámicamente en la totalidad de los seis marcos. Otras bases de datos de secuencias de la línea germinal humana, tales como la disponible de IMGT (http://imgt.cines.fr), pueden consultarse análogamente a VBASE como se ha descrito arriba.

Las identidades son coincidencias exactas de aminoácidos entre la secuencia de aminoácidos y la base de datos proteínica en toda la longitud de la secuencia. Los positivos (identidades + coincidencia de sustitución) no son idénticos excepto las sustituciones de aminoácidos guiadas por la matriz de sustitución BLOSUM62. Si la secuencia de anticuerpos hace coincidir dos de las secuencias de la base de datos con la misma identidad, se decidiría que el acierto con más positivos es el acierto de la secuencia coincidente.

Secuencias de entramado preferidas para uso en los anticuerpos de esta descripción son aquéllas que son estructuralmente similares a las secuencias de entramado utilizadas por los anticuerpos seleccionados de esta descripción, v.g., similares a las secuencias de entramado V_H 4-34 (SEQ ID NO: 51) y/o las secuencias de entramado V_H 3-53 (SEQ ID NO: 52) y/o las secuencias de entramado combinadas V_H 3-9/D3-10/JH6b (SEQ ID NO: 53) y/o las secuencias de entramado V_K A27 (SEQ ID NO: 54) y/o las

secuencias de entramado combinados V_K L6/JK1 (SEQ ID NO: 55) utilizadas por los anticuerpos monoclonales preferidos de esta descripción. Las secuencias V_H CDR1, CDR2 y CDR3 y las secuencias V_K CDR1, CDR2 y CDR3 pueden injertarse en regiones de entramado que tengan la secuencia idéntica a la encontrada en el gen de inmunoglobulina de la línea germinal del que se deriva la secuencia de entramado o las secuencias CDR pueden injertarse en regiones de entramado que contienen una o más mutaciones en comparación con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertos casos es beneficioso mutar residuos dentro de las regiones de entramado para mantener o mejorar la capacidad de fijación de antígeno del anticuerpo (véanse, v.g., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5530101; 5585089, 5693762 y 6180370 otorgadas a Queen *et al*).

Otro tipo de modificación de la región variable consiste en mutar residuos de aminoácidos dentro de las regiones V_H y/o V_K CDR1, CDR2 y/o CDR3 para mejorar con ello una o más propiedades de fijación (v.g., afinidad) del anticuerpo de interés. La mutagénesis orientada o mutagénesis mediada por PCR puede realizarse para introducir la o las mutaciones y el efecto de la fijación del anticuerpo u otra propiedad funcional de interés, puede evaluarse en ensayos in vitro o in vivo como se describen en esta memoria y se proporcionan en los Ejemplos. Se introducen modificaciones típicamente conservadoras (como se han expuesto anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones de aminoácidos,

adiciones o deleciones, pero típicamente son sustituciones. Además, típicamente no se alteran más de 1, 2, 3, 4 ó 5 residuos dentro de una región CDR.

De acuerdo con ello, en otra realización, esta descripción proporciona un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo monoclonal anti-B7-H4 o porciones de fijación de antígeno del mismo, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende: (a) una región CDR1 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14, y 15 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14 y 15; (b) una región CDR2 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 16, 17, 18, 19 y 20 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 16, 17, 18, 19 y 20; (c) una región CDR3 de V_H que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24 y 25 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24 y 25; (d) una región CDR1 de V_K que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29 y 30 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o

cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29 y 30; (e) una región CDR2 de V_K que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34 y 35 o una secuencia de aminoácidos que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34 y 35; y (f) una región CDR3 de V_K que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39 y 40 o una secuencia de aminoácidos que tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39 y 40.

Los anticuerpos elaborados por ingeniería genética de esta descripción incluyen aquéllos en los cuales se han hecho modificaciones en residuos de entramado dentro de V_H y/o V_K, v.g. para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, tales modificaciones de entramado se hacen para reducir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque consiste en "retromutar" uno o más residuos de entramado a la secuencia de la línea germinal correspondiente. De modo más específico, un anticuerpo que ha sufrido mutación somática puede contener residuos de entramado que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Tales residuos pueden identificarse por comparación de las secuencias de

entramado del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo.

Por ejemplo, para 1G11, el residuo de aminoácido #71 (dentro de FR3) de V_H es una alanina, mientras que este residuo en la secuencia de la línea germinal V_H 4-34 correspondiente es una valina. Para devolver las secuencias de regiones de entramado a su configuración en la línea germinal, las mutaciones somáticas pueden "retromutarse" a la secuencia de la línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis orientada o mutagénesis mediada por PCR (v.g., el residuo #71 de FR3 de la V_H de 1G11 puede "retromutarse" de alanina a valina). Dichos anticuerpos "retromutados" deben considerarse también abarcados por esta descripción.

Como otro ejemplo, para 1G11, el residuo de aminoácido #81 (dentro de FR3) de V_H es una arginina, mientras que este residuo en la secuencia de la línea germinal V_H 4-34 correspondiente es una lisina. Para hacer volver las secuencias de la región de entramado a su configuración en la línea germinal, por ejemplo, el residuo #81 de FR3 de la V_H de 1G11 puede "retromutarse" de arginina a lisina. Tales anticuerpos "retromutados" deben considerarse también abarcados por esta descripción.

Como otro ejemplo, para 13D12, el residuo de aminoácido #83 (dentro de FR3) de V_H es una asparagina, mientras que este residuo en la secuencia de la línea germinal V_H 4-34 correspondiente es una serina. Para hacer volver las

secuencias de la región de entramado a su configuración en la línea germinal, por ejemplo, el residuo #83 de FR3 de la V_H de 13D12 puede "retromutarse" de asparagina a serina. Tales anticuerpos "retromutados" deben considerarse también abarcados por esta descripción.

Como otro ejemplo, para 2A7, el residuo de aminoácido #67 (dentro de FR3) de V_H es una valina, mientras que este residuo en la secuencia de la línea germinal V_H 3-53 correspondiente es una fenilalanina. Para hacer volver las secuencias de la región de entramado a su configuración en la línea germinal, por ejemplo, el residuo #67 de FR3 de la V_H de 2A7 puede "retromutarse" de valina a fenilalanina. Tales anticuerpos "retromutados" deben considerarse también abarcados por esta descripción.

Como otro ejemplo, para 2F9, el residuo de aminoácido #28 (dentro de FR1) de V_H es una isoleucina, mientras que este residuo en la secuencia de la línea germinal V_H 3-53 correspondiente es una treonina. Para hacer volver las secuencias de la región de entramado a su configuración en la línea germinal, por ejemplo, el residuo #28 de FR1 de la V_H de 2F9 puede "retromutarse" de isoleucina a treonina. Tales anticuerpos "retromutados" deben considerarse también abarcados por esta descripción.

Como otro ejemplo, para 12E1, el residuo de aminoácido #23 (dentro de FR1) de V_H es una valina, mientras que el residuo en la secuencia de la línea germinal V_H 3-9

correspondiente es una alanina. Para hacer volver las secuencias de la región de entramado a su configuración en la línea germinal, por ejemplo, el residuo #23 de FR1 de la V_H de 12E1 puede "retromutarse" de valina a alanina. Tales anticuerpos "retromutados" deben considerarse también abarcados por esta descripción.

Como un ejemplo adicional, para 1G11, el residuo de aminoácido #7 (dentro de FR1) de V_K es una fenilalanina, mientras que este residuo en la secuencia de la línea germinal V_K de A27 correspondiente es una serina. Para hacer volver las secuencias de la región de entramado a su configuración en la línea germinal, por ejemplo, el residuo #7 de FR1 de la V_K de 1G11 puede "retromutarse" de fenilalanina a serina. Tales anticuerpos "retromutados" deben considerarse también abarcados por esta descripción.

Como otro ejemplo, para 1G11, el residuo de aminoácido #47 (dentro de FR2) de V_K es una valina, mientras que este residuo en la secuencia de la línea germinal V_K de A27 correspondiente es una leucina. Para hacer volver las secuencias de la región de entramado a su configuración en la línea germinal, por ejemplo, el residuo #47 de FR2 de la V_K de 1G11 puede "retromutarse" de valina a leucina. Tales anticuerpos "retromutados" deben considerarse también abarcados por esta descripción.

Otro tipo de modificación de entramado implica mutar uno o más residuos dentro de la región de entramado o incluso

dentro de una o más regiones CDR, a fin de eliminar los epítopes de las células T para reducir con ello la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. A este enfoque se hace referencia también como "desinmunización" y se describe con mayor detalle en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20030153043 por Carr *et al.*

Además de alternativas a las modificaciones realizadas dentro del entramado de las regiones CDR, los anticuerpos de la invención pueden modificarse por ingeniería genética para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como semivida en suero, fijación del complemento, fijación de receptores Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Adicionalmente, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (*v.g.*, pueden fijarse uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, de nuevo para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada una de estas realizaciones se describe con detalle adicional más adelante. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice UE de Kabat.

En una realización, la región bisagra de CH1 se modifica de tal manera que el número de residuos cisteína en la región bisagra se altera, *v.g.*, se aumenta o se reduce. Este enfoque se describe adicionalmente en la Patente de los Estados Unidos No. 5677425 por Bodmer *et al.* El número de residuos cisteína en la región bisagra de CH1 se altera,

por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o reducir la estabilidad del anticuerpo.

En otra realización, la región bisagra Fc del anticuerpo se muta para acortar la semivida biológica del anticuerpo. De modo más específico, se introducen una o más mutaciones de aminoácidos en la región de interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra Fc de tal modo que el anticuerpo tiene una fijación deteriorada de la proteína estafilocócica A (SpA) con relación a la fijación de SpA del dominio bisagra de Fc nativo. Este enfoque se describe con mayor detalle en la Patente de los Estados Unidos No. 6165745 por Ward *et al.*

En otra realización, el anticuerpo se modifica para aumentar su semivida biológica. Son posibles diversos enfoques. Por ejemplo, pueden introducirse una o más de las mutaciones siguientes: T252L, T254S, T256F, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6277375 otorgada a Ward. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o C_L para contener un epítope de fijación del receptor de salvamento tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5869046 y 6121022 otorgadas a Presta *et al.*

En otras realizaciones adicionales, la región Fc se altera por reemplazamiento de al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar la o las funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente de tal modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada para un ligando efector, pero retenga la capacidad de fijación de antígeno del anticuerpo originario. El ligando efector para el cual se altera dicha afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Este enfoque se describe con mayor detalle en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5624821 y 5648260, otorgadas ambas a Winter *et al.*

En otro ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 329, 331 y 322 pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente tal que el anticuerpo tenga alterada la fijación de C1q y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) reducida o anulada. Este enfoque se describe con mayor detalle en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6194551 por Idusogie *et al.*

En otro ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de las posiciones de los aminoácidos 231 y 239 se alteran para alterar con ello la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque se describe

adicionalmente en la publicación PCT WO 94/29351 por Bodmer *et al.*

En otro ejemplo adicional, la región Fc se modifica para aumentar la aptitud del anticuerpo para mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo para un receptor Fcγ por modificación de uno o más aminoácidos en las posiciones siguientes: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ó 439. Este enfoque se describe adicionalmente en la publicación PCT WO 00/42072 por Presta. Además, los sitios de fijación en IgG1 humana para FcγR1, FcγRII, FcγRIII y FcRn han sido mapeados y se han descrito variantes con fijación mejorada (véase Shields, R.L. *et al.*, (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Se demostró que mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la fijación a FcγRIII. Adicionalmente, se demostró que los mutantes de combinación siguientes mejoran la fijación de FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

En otra realización adicional, el extremo del terminal C de un anticuerpo de la presente invención se modifica por la introducción de un residuo cisteína como se describe en la

Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos Núm. de Serie 60/957271, que se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad. Tales modificaciones incluyen, pero sin carácter limitante, el reemplazo de un residuo de aminoácido existente en o cerca del término C de una secuencia de cadena pesada de longitud total, así como la introducción de una extensión que contiene cisteína en el término C de una secuencia de cadena pesada de longitud total. En realizaciones preferidas, la extensión que contiene cisteína comprende la secuencia alanina-alanina-cisteína (del terminal N al terminal C).

En realizaciones preferidas, la presencia de tales modificaciones de cisteína en el terminal C proporciona una localización para conjugación de una molécula asociada, tal como un agente terapéutico o una molécula marcadora. En particular, la presencia de un grupo tiol reactivo, debido a la modificación de cisteína en el terminal C, puede utilizarse para conjugar una molécula asociada que emplea los enlazadores disulfuro descritos con mayor detalle más adelante. La conjugación del anticuerpo a una molécula asociada de esta manera permite un control incrementado sobre el sitio específico de fijación. Adicionalmente, por introducción del sitio de fijación en o cerca del término C, la conjugación puede optimizarse de tal manera que la misma reduzca o elimine la interferencia con las propiedades funcionales del anticuerpo, y permita un análisis y control de calidad simplificados de las preparaciones de conjugados.

En otra realización adicional, se modifica la glicosilación de un anticuerpo. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo aglicosilado (*es decir*, que el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos pueden realizarse mediante, por ejemplo, alteración de uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, pueden hacerse una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación de entramado en la región variable para eliminar con ello la glicosilación en dicho sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo para el antígeno. Un enfoque de este tipo se describe con mayor detalle en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5714350 y 6350861 otorgadas a Co *et al.* Enfoques adicionales para alteración de la glicosilación se describen con mayor detalle en las Patentes de los Estados Unidos 5,714,350 y 6,350,861 otorgadas a Co *et al.* Enfoques adicionales para alterar la glicosilación se describen con mayor detalle en la Patente de los Estados Unidos 7.214.775 otorgada a Hanai *et al.*, la Patente de los Estados Unidos No. 6.737.056 otorgada a Presta, la Publicación de los Estados Unidos No. 20070020260 otorgada a Presta, la Publicación PCT No. WO/2007/084926 otorgada a Dickey *et al.*, la Publicación PCT No. WO/2006/089294 otorgada a Zhu *et al.*, y la Publicación PCT No. WO/2007/055916 otorgada a Ravetch *et al.*, cada una

de las cuales se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad.

Adicionalmente o como alternativa, puede producirse un anticuerpo que tiene un tipo de glicosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo que tenga GlcNac de bisección. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos pueden realizarse mediante, por ejemplo, expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glicosilación alterada. Células con maquinaria de glicosilación alterada han sido descritas en la técnica y pueden utilizarse como células hospedadoras en las cuales se expresan los anticuerpos recombinantes de la invención para producir con ello un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas de células Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (alfa-(1,6)-fucosiltransferasa), de tal modo que los anticuerpos expresados en las líneas de células Ms704, Ms705 y Ms709 carecen de fucosa en sus carbohidratos. Se crearon las líneas de células Ms704, Ms705 y Ms709 $FUT8^{-/-}$ por la desorganización direccionada del gen FUT8 en células CHO/DG44 utilizando dos vectores de reposición (véase la publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20040110704 por Yamane *et al.* y Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Como otro ejemplo, el documento EP 1176195 por Hanai *et al.* describe una línea de

células con un gen FUT8 funcionalmente desorganizado, que codifica una fucosiltransferasa, de tal modo que los anticuerpos expresados en una línea de células de este tipo exhiben hipofucosilación por reducción o eliminación de la enzima afín al enlace alfa-1,6. Hanai *et al.* describen también líneas de células que tienen una baja actividad enzimática por adición de fucosa a la N-acetilglucosamina que se fija a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo la línea de células de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La publicación PCT WO 03/035835 por Presta describe una línea de células CHO variante, las células Lec13, con capacidad reducida para fijar fucosa a carbohidratos enlazados a Asn(297), también resultando en la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en dicha célula hospedadora (véase también Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277. 26733-26740). La publicación PCT WO 99/54342 por Umana *et al.* describe líneas de células modificadas por ingeniería genética para expresar glicosil-transferasas modificantes de glicoproteínas (v.g., beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) tales que los anticuerpos expresados en las líneas de células modificadas por ingeniería genética exhiben estructuras GlcNac de bisección incrementadas, lo que da como resultado una actividad incrementada de ADCC de los anticuerpos (véase también Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Como alternativa, los residuos fucosa del anticuerpo pueden escindirse utilizando una enzima fucosidasa. Por ejemplo, la fucosidasa alfa-L-fucosidasa elimina residuos fucosilo

de los anticuerpos (Tarentino, A.L. *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

Adicionalmente o como alternativa, puede fabricarse un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación, donde dicha alteración hace referencia al nivel de sialilación del anticuerpo. Tales alteraciones se describen en la publicación PCT No. WO /2007/084926 otorgada a Dickey *et al.*, y la publicación PCT No. WO /2007/055916 otorgada a Ravetch *et al.*, las dos cuales se incorporan por referencia en su totalidad. Por ejemplo, puede emplearse una reacción enzimática con sialidasa, tal como, por ejemplo, sialidasa de Arthrobacter ureafaciens. Las condiciones de una reacción de este tipo se describen generalmente en la Patente de los Estados Unidos No. 5831077, que se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad. Otros ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas son neuraminidasa y N-glicosidasa F, como se describe en Schloemer *et al.*, *J. Virology*, 15(4), 882-893 (1975) y en Leibiger *et al.*, *Biochem J.*, 338, 529-538 (1999), respectivamente. Los anticuerpos desialilados pueden purificarse ulteriormente por utilización de cromatografía de afinidad. Como alternativa, pueden emplearse métodos para aumentar el nivel de sialilación, por ejemplo empleando enzimas sialiltransferasas. Las condiciones de una reacción de este tipo se describen generalmente en Basset *et al.*, *Scandinavian Journal of Immunology*, 51(3), 307-311 (2000).

Otra modificación de los anticuerpos de esta memoria que se contempla por la invención es la pegilación. Un anticuerpo puede pegilarse para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (v.g., en suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, se hace reaccionar típicamente con polietilen-glicol (PEG), tal como un derivado éster o aldehído reactivo de PEG, en condiciones en las cuales llegan a fijarse uno o más grupos PEG al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferiblemente, la pegilación se lleva a cabo por una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo). Como se utiliza en esta memoria, debe entenderse que el término "poli-etilen-glicol" abarca cualquiera de las formas de PEG que han sido utilizadas para derivatizar otras proteínas, tales como mono-(C1-C10)-alcoxi- o ariloxi-polietilen-glicol o polietilen-glicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo a pegilar es un anticuerpo aglicosilado. Métodos para pegilación de proteínas se conocen en la técnica y pueden aplicarse a los anticuerpos de la invención. Véanse por ejemplo, los documentos EP 0154316 otorgado a Nishimura *et al.* y EP 0401348 otorgado a Ishikawa *et al.*

Fragmentos de Anticuerpos y Miméticos de Anticuerpos

Los conjugados de esta invención no son anticuerpos tradicionales limitados en cuanto al componente de fijación de antígeno y pueden llevarse a práctica mediante el uso de fragmentos de anticuerpos y miméticos de anticuerpos. Una

gran diversidad de fragmentos de anticuerpos y tecnologías de miméticos de anticuerpos han sido desarrolladas y son muy conocidas en la técnica.

Los anticuerpos de dominio (dAbs) son las unidades de fijación funcionales más pequeñas de los anticuerpos - peso molecular aproximadamente 13 kDa - y corresponden a las regiones variables de las cadenas pesada (VH) o ligera (V_L) de los anticuerpos. Detalles adicionales en cuanto a anticuerpos de dominio y métodos para su producción se encuentran en las Patentes de los Estados Unidos 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197 y 6.696.245; la Patente de los Estados Unidos 2004/0110941; EP 1433846, 0368684 y 0616640; WO 2005/035572, 2004/101790, 2004/081026, 2004/058821, 2004/003019 y 2003/002609, cada uno de los cuales se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad.

Los Nanocuerpos son proteínas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales singulares de los anticuerpos de cadena pesada existentes naturalmente. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un dominio variable simple (VHH) y dos dominios constantes (CH2 y CH3). Es importante que el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido estable que alberga la capacidad total de fijación de antígeno del anticuerpo de cadena pesada original. Los Nanocuerpos tienen una alta homología con los dominios VH de anticuerpos humanos y pueden humanizarse ulteriormente sin pérdida alguna de actividad.

Es importante que los Nanocuerpos tienen un bajo potencial inmunógeno.

Los nanocuerpos combinan las ventajas de los anticuerpos convencionales con características importantes de fármacos de molécula pequeña. Al igual que los anticuerpos convencionales, los nanocuerpos exhiben una alta especificidad y afinidad de diana y baja toxicidad inherente. Adicionalmente, los nanocuerpos son extremadamente estables, pueden administrarse por medios distintos de la inyección (véase, v.g. el documento WO 2004/041867) y son fáciles de fabricar. Otras ventajas de los nanocuerpos incluyen el reconocimiento de epítopes infrecuentes u ocultos como resultado de su pequeño tamaño, fijándose en cavidades o sitios activos de dianas proteínicas con afinidad y selectividad altas debido a su flexibilidad tridimensional singular en formato de fármaco, adaptación de la semivida y facilidad y velocidad de descubrimiento de fármacos.

Los nanocuerpos son codificados por genes simples y se producen eficientemente en la práctica totalidad de los hospedadores procariotas y eucariotas, v.g., E. coli (véase, v.g., la Patente de los Estados Unidos 6765087, que se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad), mohos (por ejemplo Aspergillus o Trichoderma) y levaduras (por ejemplo Saccharomyces, Kluyveromyces, Hansenula o Pichia) (véase, por ejemplo, el documento de

los Estados Unidos 6838254, que se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad).

El método Nanoclone (véase, v.g. WO 06/079372, que se incorpora en esta memoria por referencia en su totalidad) genera nanocuerpos contra una diana deseada, basados en la selección automática de alta capacidad de las células B, y podría ser utilizado en el contexto de la presente invención.

Los Unicuerpos son otra tecnología de fragmentos de anticuerpo, basada en la eliminación de la región bisagra de los anticuerpos IgG4. La deleción de la región bisagra da como resultado una molécula que tiene esencialmente la mitad del tamaño de un anticuerpo IgG4 tradicional y tiene una región de fijación univalente en lugar de una región de fijación bivalente. Adicionalmente, debido a que los Unicuerpos son algo más pequeños, pueden exhibir una mejor distribución en tumores sólidos mayores con eficacia potencialmente ventajosa. Detalles adicionales acerca de los Unicuerpos pueden obtenerse por referencia a WO 2007/059782, que se incorpora por referencia en su totalidad.

Las moléculas de Afficuerpos son proteínas de afinidad basadas en un dominio proteínico con 58 restos de aminoácidos derivado de un dominio de fijación de IgG con haz de tres hélices de la proteína estafilocócica A. Este dominio ha sido utilizado como armazón para la construcción

de colecciones combinatorias de fagémidos, del cual pueden seleccionarse variantes de Afficuerpos direccionadas a las moléculas deseadas, utilizando tecnología de presentación de fago (Nord *et al.*, Nat Biotechnol 1997; 15:772-7; Ronmark *et al.*, Eur J Biochem 2002; 269:2647-55). La estructura simple y robusta y el peso molecular bajo (6 kDa) de las moléculas de Afficuerpos hace que los mismos sean adecuados para una gran diversidad de aplicaciones, tales como detección de reactivos e inhibidores de interacciones con receptores. Detalles adicionales sobre Afficuerpos se encuentran en el documento de los Estados Unidos 5831012 que se incorpora por referencia en su totalidad. Afficuerpos marcados pueden ser también útiles en aplicaciones de producción de imágenes para determinar la abundancia de isoformas.

Las DARPins (Proteínas Diseñadas de Repetición de Anquirina) materializan la tecnología mimética de anticuerpos DRP (proteína diseñada de repetición) que aprovecha las aptitudes de fijación de polipéptidos distintos de los anticuerpos. Las proteínas de repetición, tales como las proteínas de repetición ricas en anquirina y leucina, son moléculas de fijación ubicuas que, al contrario que los anticuerpos, existen intra y extracelularmente. Su singular arquitectura modular caracteriza unidades estructurales repetitivas (repeticiones) que se apilan unas a otras para formar dominios de repetición alargados que exhiben superficies de fijación de diana variables y modulares. Basándose en esta

modularidad, pueden crearse colecciones combinatorias de polipéptidos con especificidades de fijación muy diversificadas. Esta estrategia incluye el diseño de consenso de repeticiones autocompatibles que exhiben residuos de superficie variables y su ensamblaje aleatorio en dominios de repetición. Información adicional acerca de DARPins y otras tecnologías DRP puede encontrarse en los documentos de los Estados Unidos 2004/0132028 y WO 02/20565, los dos cuales se incorporan por referencia.

Las Anticalinas son otra tecnología mimética de anticuerpos. En este caso, la especificidad de fijación se deriva de lipocalinas, una familia de proteínas de peso molecular bajo que se expresan natural y abundantemente en los tejidos y fluidos corporales humanos. Las lipocalinas han evolucionado para realizar una gama de funciones asociadas in vivo con el transporte y almacenamiento fisiológico de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Las lipocalinas tienen una estructura intrínseca robusta que comprende un barril β altamente conservado que soporta 4 bucles en un extremo de la proteína. Estos bucles forman la entrada a una bolsa de fijación, y las diferencias de conformación en esta parte de la molécula dan cuenta de la variación en especificidad de fijación entre las lipocalinas individuales.

Si bien la estructura global de los bucles hipervariables soportados por un entramado conservado de hoja β es reminiscente de las inmunoglobulinas, las lipocalinas

difieren considerablemente de los anticuerpos en términos de tamaño, estando compuestas de una sola cadena polipeptídica de 160-180 aminoácidos, que es marginalmente mayor que un dominio de simple inmunoglobulina.

Las lipocalinas pueden clonarse y sus bucles someterse a ingeniería genética para crear las Anticalinas. Se han generado colecciones de Anticalinas estructuralmente diversas y la presentación de las Anticalinas permite la selección y el cribado de la función de fijación, seguida por la expresión y producción de proteína soluble para análisis ulterior en sistemas procariotas o eucariotas. Estudios realizados han demostrado que pueden producirse Anticalinas que son específicas virtualmente para cualquier proteína diana humana y pueden obtenerse afinidades de fijación en el campo nanomolar o mayor. Información adicional acerca de Anticalinas puede encontrarse en los documentos de los Estados Unidos 7250297 y WO 99/16873, los dos cuales se incorporan en esta memoria por referencia en su totalidad.

Los Avímeros son otro tipo de tecnología mimética de anticuerpos útil en el contexto de la presente invención. Los Avímeros se han desarrollado a partir de una gran familia de dominios de receptores extracelulares humanos por desordenamiento de exones in vitro y presentación de fago, generando proteínas multidominio con propiedades de fijación e inhibición. Se ha demostrado que el enlace de dominios de fijación independientes múltiples crea avidez y

da como resultado afinidad y especificidad mejoradas en comparación con las proteínas de fijación convencionales de un solo epítope. Otras ventajas potenciales incluyen la producción simple y eficiente de moléculas específicas de dianas múltiples en Escherichia coli, estabilidad térmica y resistencia frente a las proteasas mejoradas. Se han obtenido Avímeros con afinidades subnanomolares contra una diversidad de dianas. Información adicional concerniente a Avímeros puede encontrarse en los documentos de los Estados Unidos 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756, todos los cuales se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

Los Versacuerpos son otra tecnología mimética de anticuerpos que puede utilizarse en el contexto de la presente invención. Los Versacuerpos son pequeñas proteínas de 3-5 kDa con > 15% de cisteínas, que forman un armazón con alta densidad de disulfuro que reemplazan el núcleo hidrófobo que poseen las proteínas típicas. Este reemplazo da como resultado una proteína que es más pequeña, más hidrófila (es decir, menos propensa a agregación y fijación inespecíficas) es más resistente a las proteasas y al calor, y tiene una menor densidad de epítopes de células T, debido a que los residuos que contribuyen en mayor grado a la presentación del MHC son hidrófobos. Es bien conocido que estas propiedades afectan a la inmunogenicidad, y en

conjunto se espera que causen una gran disminución en la inmunogenicidad.

Dada la estructura de los Versacuerpos, estos miméticos de anticuerpos ofrecen un formato versátil que incluye multivalencia, multiespecificidad, una diversidad de mecanismos de semivida, módulos de direccionamiento a tejidos y la ausencia de la región Fc del anticuerpo. Adicionalmente, los Versacuerpos se fabrican en E. coli con rendimientos elevados, y debido a su carácter hidrófilo y su pequeño tamaño, los Versacuerpos son muy solubles y pueden formularse a altas concentraciones. Los Versacuerpos son excepcionalmente termoestables y ofrecen una semivida prolongada. Información adicional acerca de Versacuerpos puede encontrarse en el documento de los Estados Unidos 2007/0191272, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

Las descripciones anteriores de fragmentos de anticuerpos y tecnologías miméticas no pretenden ser exhaustivas. Una diversidad de tecnologías adicionales que incluyen tecnologías alternativas basadas en polipéptidos, tales como fusiones de regiones determinantes de la complementariedad como ha sido reseñado en Qui *et al.*, Nature Biotechnology, 25 (8) 921-929 (2007), así como tecnologías basadas en ácidos nucleicos, tales como las tecnologías de aptámero de RNA descritas en los documentos de los Estados Unidos 5.789.157; 5.864.026; 5.712.375; 5.763.566; 6.013.443; 6.376.474; 6.613.526; 6.114.120;

6.261.774 y 6.387.620; todos los cuales se incorporan en la presente por referencia, podrían utilizarse en el contexto de la presente invención.

Propiedades Físicas de los Anticuerpos

Los anticuerpos de la presente descripción pueden caracterizarse ulteriormente por las diversas propiedades físicas de los anticuerpos anti-B7-H4. Pueden utilizarse diversos ensayos para detectar y/o diferenciar diferentes clases de anticuerpos basadas en estas propiedades físicas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente descripción pueden contener uno o más sitios de glicosilación sea en la región variable de la cadena ligera o la región variable de la cadena pesada. La presencia de uno o más sitios de glicosilación en la región variable puede dar como resultado inmunogenicidad incrementada del anticuerpo o una alteración del pK del anticuerpo debido a la fijación alterada del antígeno (Marshall *et al.* (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA y Morrison SL (2004) *J. Immunol* 172:5489-94; Wallick *et al* (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh *et al* (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura *et al.* (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). Se sabe ahora que ocurre glicosilación en motivos que contienen una secuencia N-X-S/T. La glicosilación en la región variable puede testarse utilizando un ensayo Glycoblot, que escinde el anticuerpo para producir un Fab, y testa luego en cuanto a glicosilación utilizando un ensayo que mide la oxidación

con peryodato y la formación de bases de Schiff. Como alternativa, la glicosilación de la región variable puede testarse utilizando cromatografía Dionex light (Dionex-LC), que escinde los sacáridos de un Fab en monosacáridos y analiza el contenido individual de sacáridos. En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-B7-H4 que no contiene glicosilación en la región variable. Esto puede lograrse sea por selección de anticuerpos que no contienen el motivo de glicosilación en la región variable o por mutación de residuos dentro del motivo de glicosilación utilizando métodos estándar bien conocidos en la técnica.

En una realización preferida, los anticuerpos de la presente descripción no contienen sitios de isomería de asparagina. Un efecto de desamidación o ácido isoaspártico puede producirse en secuencias N-G o D-G, respectivamente. El efecto de desamidación o ácido isoaspártico da como resultado la creación de ácido isoaspártico que reduce la estabilidad de un anticuerpo por creación de una estructura enroscada fuera de un término carboxi de la cadena lateral más bien que de la cadena principal. La creación de ácido isoaspártico puede medirse utilizando un ensayo iso-quant, que utiliza una HPLC en fase inversa para testar la presencia de ácido isoaspártico.

Cada anticuerpo tendrá un punto isoeléctrico singular (pI), pero generalmente los anticuerpos caerán dentro del intervalo de pH comprendido entre 6 y 9,5. El pI para un anticuerpo IgG1 cae típicamente dentro del intervalo de pH

de 7-9,5 y el pI para un anticuerpo IgG4 cae típicamente dentro del intervalo de pH de 6-8. Los anticuerpos pueden tener un pI que está fuera de este intervalo. Aunque los efectos son generalmente desconocidos, existe la especulación de que los anticuerpos con un pI fuera del intervalo normal pueden tener cierto despliegue e inestabilidad en condiciones *in vivo*. El punto isoeléctrico puede testarse utilizando un ensayo de enfoque isoeléctrico capilar, que crea un gradiente de pH y puede utilizar enfoque láser para exactitud incrementada (Janini *et al.* (2002) *Electrophoresis* 23:1605-11; Ma *et al.* (2001) *Chromatographia* 53:S75-89; Hunt *et al.* (1998) *J. Chromatogr A* 800:355-67). En algunos casos, se prefiere tener un anticuerpo anti-B7-H4 que tenga un valor pI que caiga dentro del intervalo normal. Esto puede conseguirse sea por selección de anticuerpos con un pI en el intervalo normal, o por mutación de residuos con carga superficial utilizando métodos estándar bien conocidos en la técnica.

Cada anticuerpo tendrá una temperatura de fusión que es indicativa de su estabilidad térmica (Krishnamurthy R y Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). Una mayor estabilidad térmica indica mayor estabilidad global del anticuerpo *in vivo*. El punto de fusión del anticuerpo puede medirse utilizando técnicas tales como calorimetría de barrido diferencial (Chen *et al.* (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando *et al.* (1999) *Immunol Lett* 68:47-52). T_{M1} indica la temperatura del despliegue inicial del anticuerpo. T_{M2} indica la temperatura de despliegue

completo del anticuerpo. Generalmente, se prefiere que el valor T_{M1} de un anticuerpo de la presente descripción sea mayor que 60°C, preferiblemente mayor que 65°C, aún más preferiblemente mayor que 70°C. Como alternativa, la estabilidad térmica de un anticuerpo puede medirse utilizando dicroísmo circular (Murray *et al.* (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

En una realización preferida, se seleccionan anticuerpos que no se degradan rápidamente. La fragmentación de un anticuerpo anti-B7-H4 puede medirse utilizando electroforesis capilar (CE) y MALDI-MS, como es bien conocido en la técnica (Alexander AJ y Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

En otra realización preferida, se seleccionan anticuerpos que tienen efectos de agregación mínimos. La agregación puede conducir al desencadenamiento de una respuesta inmune indeseable y/o propiedades farmacocinéticas alteradas o desfavorables. Generalmente, los anticuerpos son aceptables con agregación de 25% o menos, preferiblemente 20% o menos, aún más preferiblemente 15% o menos, todavía más preferiblemente 10% o menos y aún más preferiblemente 5% o menos. La agregación puede medirse por varios métodos bien conocidos en la técnica, que incluyen cromatografía de exclusión de tamaños (SEC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y dispersión de la luz para identificar monómeros, dímeros, trímeros o multímeros.

Métodos de Modificación de Anticuerpos por Ingeniería Genética

Como se ha expuesto anteriormente, los anticuerpos anti-B7-H4 que tienen secuencias V_H y V_K descritos en esta memoria pueden utilizarse para crear nuevos anticuerpos anti-B7-H4 por modificación de las secuencias V_H y/o V_K de la o las regiones constantes unidas a los mismos. Así, en otro aspecto de esta descripción, las características estructurales de un anticuerpo anti-B7-H4 de esta descripción, v.g. 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 o 13D12, se utilizan para crear anticuerpos anti-B7-H4 estructuralmente afines que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de esta descripción, tales como la fijación a B7-H4 humana. Por ejemplo, una o más regiones CDR de 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 o 13D12 o mutaciones de los mismos, pueden combinarse recombinantemente con regiones de entramado conocidas y/u otras CDRs para crear anticuerpos anti-B7-H4 adicionales, modificados por ingeniería genética recombinante de esta descripción, como se expone anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen las descritas en la sección anterior. El material de partida para el método de modificación por ingeniería genética es una o más de las secuencias V_H y/o V_K proporcionadas en esta memoria o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo modificado por ingeniería genética, no es necesario preparar realmente (es decir expresar como proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias V_H y/o VR proporcionadas en esta memoria o una o más regiones CDR de las mismas. En lugar de ello, se

utiliza la información contenida en la o las secuencias como el material de partida para crear una o más secuencias de "segunda generación" derivada(s) de la o las secuencias originales, y después de ello se prepara(n) la o las secuencias de "segunda generación", y se expresan como proteína.

De acuerdo con ello, en otra realización, esta descripción proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-B7-H4 que comprende:

(a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de la región variable de cadena pesada que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 11, 12, 13, 14 y 15, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 16, 17, 18, 19 y 20 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 21, 22, 23, 24 y 25; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de la región variable de cadena ligera que comprende una secuencia CDR1 seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 26, 27, 28, 29 y 30, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 31, 32, 33, 34 y 35 y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 36, 37, 38, 39 y 40;

(b) alterar al menos un residuo de aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpos de la región variable de cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpos de la región variable de cadena ligera para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y

(c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

Pueden utilizarse técnicas estándar de biología molecular para preparar y expresar la secuencia de anticuerpo alterada. Típicamente, el anticuerpo codificado por la o las secuencias de un anticuerpo alteradas es uno que retiene una, algunas o la totalidad de las propiedades funcionales de los anticuerpos anti-B7-H4 descritos en esta memoria, propiedades funcionales que incluyen, pero sin carácter limitante:

(a) fijación a B7-H4 humana con un KD de 1 x 10^{-7} M o menos;

(b) fijación a células CHO o humanas transfectadas con B7-H4;

(d) capacidad para mediar ADCC contra células que expresan B7-H4; y/o

(e) inhibición del crecimiento de células que expresan B7-H4 *in vivo* cuando se conjuga a una citotoxina.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados pueden evaluarse utilizando ensayos estándar disponibles en la técnica y/o descritos en esta memoria, tales como los indicados en los Ejemplos (v.g., citometría de flujo, ensayos de fijación).

En ciertas realizaciones de los métodos de modificación por ingeniería genética de los anticuerpos de esta descripción, pueden introducirse mutaciones aleatoria o selectivamente a

lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-B7-H4, y los anticuerpos anti-B7-H4 modificados resultantes pueden cribarse respecto a actividad de fijación y/u otras propiedades funcionales como se describe en esta memoria. Métodos de mutación han sido descritos en la técnica. Por ejemplo, la publicación PCT WO 02/092780 por Short describe métodos para creación y cribado de mutaciones de anticuerpos utilizando mutagénesis de saturación, ensamblaje sintético por ligación o una combinación de los mismos. Como alternativa, la Publicación PCT WO 03/074679 por Lazar *et al.* describe métodos de utilización de métodos de cribado por ordenador para optimizar las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de Ácido Nucleico que Codifican los Anticuerpos de esta Descripción

Otro aspecto de esta descripción hace referencia a moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de esta descripción. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado de células o en forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico está "aislado" o "hecho sustancialmente puro" cuando se ha liberado por purificación de otros componentes celulares u otros contaminantes, v.g., otros ácidos nucleicos celulares o proteínas, por técnicas estándar, con inclusión de tratamiento con álcali/SDS, formación de bandas en CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de azarosa y otros bien conocidos en

la técnica. Véase, F. Ausubel, *et al.*, compilador (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing y Wiley Interscience, Nueva York. Un ácido nucleico de esta descripción puede ser, por ejemplo, DNA o RNA y puede contener o no secuencias intrónicas. En otra realización preferida, el ácido nucleico es una molécula de cDNA.

Los ácidos nucleicos de esta descripción pueden obtenerse utilizando técnicas estándar de biología molecular. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (*v.g.*, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que llevan genes de inmunoglobulina humanos como se describe con mayor detalle más adelante), pueden obtenerse cDNAs que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo producido por el hibridoma por amplificación estándar PCR o técnicas de clonación de cDNA. Para los anticuerpos obtenidos a partir de una genoteca de genes de inmunoglobulina (*v.g.*, utilizando técnicas de presentación de fago), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse de la genoteca. Moléculas de ácido nucleico preferidas de esta descripción son aquéllas que codifican las secuencias V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 o 13D12. Las secuencias de DNA que codifican las secuencias V_H de 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12 se muestran en SEQ ID NOs: 41, 42, 43, 44 y 45, respectivamente. Secuencias de DNA que codifican las secuencias V_L de 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12 se muestran en SEQ ID NOs: 46, 47, 48, 49 y 50, respectivamente. Una vez que se obtienen fragmentos de DNA que codifican los segmentos V_H y V_L, estos fragmentos de

DNA pueden manipularse ulteriormente por técnicas estándar de DNA recombinante, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpos de longitud total, en genes de fragmentos Fab o en un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de DNA que codifica V_{L-} o V_{K-} se enlaza operativamente a otro fragmento de DNA que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible. El término "enlazado operativamente", como se utiliza en este contexto, tiene por objeto significar que los dos fragmentos de DNA están unidos de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de DNA se mantienen en marco.

El DNA aislado que codifica la región V_H puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud total enlazando operativamente el DNA que codifica V_H a otra molécula de DNA que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH15, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de la región constante de cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase, v.g. Kabat, E.A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª edición, Departamento de Sanidad y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación NIH No. 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de DNA que abarcan estas regiones por amplificación estándar mediante PCR. La región constante de cadena presada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero muy típicamente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de

cadena pesada del fragmento Fab, el DNA codificante de V_H puede estar enlazado operativamente a otra molécula de DNA que codifique únicamente la región constante CH1 de cadena pesada.

El DNA aislado que codifica la región V_L puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud total (así como un gen de cadena ligera de Fab) enlazando operativamente el DNA que codifica V_L a otra molécula de DNA que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de la región constante de cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase, v.g., Kabat, E.A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5.ª edición, Departamento de Sanidad y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación NIH No. 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de DNA que abarcan estas regiones por amplificación PCR estándar. En realizaciones preferidas, la región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de DNA que codifican V_H y V_L se enlazan operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, *v.g.*, que codifica la secuencia de aminoácidos $(Gly_4\text{-}Ser)_3$, de tal modo que las secuencias V_H y V_L pueden expresarse como una proteína de cadena simple contigua, con las regiones V_H y V_L unidas por el enlazador flexible (véase, *v.g.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

Producción de los Anticuerpos Monoclonales de esta Descripción

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) de la presente descripción pueden producirse por una diversidad de técnicas, que incluyen metodología de anticuerpos monoclonales convencional, *v.g.*, la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495. Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, *v.g.*, transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

El sistema animal preferido para preparación de hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Protocolos de inmunización y métodos para aislamiento de esplenocitos inmunizados por fusión se conocen en la técnica. Socios de fusión (*v.g.*, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión son también conocidos.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente descripción pueden prepararse sobre la base de la secuencia de un anticuerpo monoclonal no humano preparado como se ha descrito arriba. Puede obtenerse DNA codificante de las inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera a partir del

hibridoma no humano de interés y modificarse por ingeniería genética para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (*v.g.*, humanas) utilizando técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, pueden enlazarse regiones variables murinas a regiones constantes humanas utilizando métodos conocidos en la técnica (véase *v.g.*, la Patente de los Estados Unidos No. 4816567 otorgada a Cabilly *et al.*). Para crear un anticuerpo inmunizado, pueden insertarse regiones CDR murinas en un entramado humano utilizando métodos conocidos en la técnica (véase *v.g.*, la Patente de los Estados Unidos No. 5225539 otorgada a Winter, y las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5530101; 5585089; 5693762 y 6180370 otorgadas a Queen *et al.*).

En una realización preferida, los anticuerpos de esta descripción son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra B7-H4 humana puede generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones a los que se hace referencia en esta memoria como el Ratón HuMAb® y el Ratón KM®, respectivamente, y se hace referencia colectivamente a los mismos en esta memoria como "ratones con Ig humana".

El Ratón HuMAb® (Medarex® Inc.) contiene miniloci de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de

inmunoglobulina de cadena pesada (μ y γ) y ligera (κ) humanas no transpuestas, junto con mutaciones direccionadas que desactivan los loci endógenos de las cadenas μ y κ (véase *v.g.*, Lonberg, *et al.* (1994) *Nature* 368 (6474):856-859). De acuerdo con ello, los ratones exhiben expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de las cadenas humanas pesada y ligera introducidos sufren cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgGκ humanos de alta afinidad (Lonberg, N *et al.* (1994) *supra;* revisado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y el uso del Ratón HuMAb®, y las modificaciones genómicas llevadas por dichos ratones, se describen ulteriormente en Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, los contenidos de todos los cuales se incorporan específicamente en esta memoria por referencia en su totalidad. Véanse adicionalmente las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429;

otorgadas todas ellas a Lonberg y Kay; Patente de los Estados Unidos No. 5.545.807 otorgada a Surani *et al.*; Publicaciones PCT Núms. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, otorgadas todas a Lonberg y Kay; y Publicación PCT No. WO 01/14424 otorgada a Korman *et al.* Ratones transgénicos que llevan genes de cadena ligera lambda humana pueden utilizarse también, tales como los descritos en la publicación PCT No. WO 00/26373 por Bruggemann. Por ejemplo, un ratón que lleva un transgén de cadena ligera lambda humana puede cruzarse con un ratón que lleva un transgén de cadena pesada humana (*v.g.*, HCo7), y que lleva opcionalmente también un transgén de cadena ligera kappa humana (*v.g.*, KCo5), para crear un ratón que lleva a la vez transgenes humanos de cadena pesada y ligera.

En otra realización, pueden generarse anticuerpos humanos de esta descripción utilizando un ratón que lleva secuencias de inmunoglobulina humanas en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que lleva un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. A este ratón se hace referencia en esta memoria como un "Ratón KM®", y se describe en detalle en la publicación PCT WO 02/43478 otorgada a Ishida *et al.*

Además, sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden utilizarse para generar anticuerpos anti-B7-H4 de esta descripción. Por ejemplo, puede

utilizarse un sistema transgénico alternativo al que se hace referencia como el Xenorratón (Abgenix, Inc.); tales ratones se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963 otorgadas a Kucherlapati *et al.*

Adicionalmente, sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden utilizarse para generar anticuerpos anti-B7-H4 de esta descripción. Por ejemplo, pueden utilizarse ratones que llevan a la vez un transcromosoma de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana, a los que se hace referencia como "Ratones TC"; tales ratones se describen en Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:722-727. Adicionalmente, vacas que llevan transcromosomas humanos de cadena pesada y ligera han sido descritas en la técnica (*v.g.*, Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20: 889-894 y solicitud PCT No. WO 2002/092812) y pueden utilizarse para generar los anticuerpos anti-B7-H4 de esta descripción.

Anticuerpos monoclonales humanos de esta descripción pueden prepararse también utilizando métodos de presentación de fago para cribado de genotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de presentación de fago para aislamiento de anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véase por ejemplo: Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 otorgadas a Ladner

et al.; Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.427.908 y 5.580.717 otorgadas a Dower *et al.*; Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.969.108 y 6.172.197 otorgadas a McCafferty *et al.*; y Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 otorgadas a Griffiths *et al.*

Los anticuerpos monoclonales humanos de esta descripción pueden prepararse también utilizando ratones SCID en los cuales se han reconstituido células inmunes humanas de tal modo que puede generarse una respuesta de anticuerpos humanos por inmunización. Dichos ratones se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5476996 y 5698767 otorgadas a Wilson *et al.*

En otra realización, se preparan anticuerpos anti-B7-H4 humanos utilizando una combinación de técnicas de ratón con Ig humana y de presentación de fago, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6794132 por Buechler *et al.* De modo más específico, el primer método implica generar una respuesta de anticuerpos anti-B7-H4 en un ratón con Ig humana (tal como un ratón HuMab o ratón KM como se ha descrito arriba) por inmunización del ratón con uno o más antígenos B7-H4, seguido por aislamiento de ácidos nucleicos que codifican cadenas de anticuerpos humanos a partir de células linfáticas de ratón e introducción de estos ácidos nucleicos en un vector de presentación (*v.g.*, de fago) para proporcionar una genoteca de paquetes de presentación. De este modo, cada miembro de la genoteca

comprende un ácido nucleico que codifica una cadena de anticuerpo humano y cada cadena de anticuerpo es presentada por el paquete de presentación. La genoteca se criba luego con la proteína B7-H4 para aislar los miembros de la genoteca que se fijan específicamente a B7-H4. Las inserciones de ácido nucleico de los miembros seleccionados de la genoteca se aíslan luego y se secuencian por métodos estándar para determinar las secuencias variables de las cadenas ligera y pesada de los ligantes B7-H4 seleccionados. Las regiones variables pueden convertirse en cadenas de anticuerpo de longitud total por técnicas estándar de DNA recombinante, tales como clonación de las regiones variables en un vector de expresión que lleva las regiones constantes de cadenas pesada y ligera humanas de tal modo que la región V_H se enlaza operativamente a la región C_H y en la región V_L se enlaza operativamente a la región C_L.

Inmunización de Ratones con Ig Humana

Cuando se utilizan ratones con Ig humana para generar anticuerpos humanos de esta descripción, dichos ratones pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de un antígeno B7-H4 y/o proteína B7-H4 recombinante, o células que expresan una proteína B7-H4, o una proteína de fusión B7-H4, como ha sido descrito por Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; y Publicaciones PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferiblemente, los ratones tendrán una edad de 6 a 16

semanas de edad en el momento de la primera infusión. Por ejemplo, puede utilizarse una preparación purificada o recombinante (5-50 µg) de antígeno B7-H4 para inmunizar los ratones con Ig humana intraperitoneal y/o subcutáneamente. De modo muy preferible, el inmunógeno utilizado para generar los anticuerpos de esta descripción es una proteína de fusión B7-H4 que comprende el dominio extracelular de una proteína B7-H4, fusionada en su término N a un polipéptido distinto de B7-H4 (*v.g.*, un marcador His) (descrito ulteriormente en el Ejemplo 1).

Procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos que se fijan a B7-H4 humana se describen más adelante en el Ejemplo 1. La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos responden cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido por inmunizaciones por vía IP cada 2 semanas (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante de Freund incompleto. Sin embargo, se ha encontrado también que son eficaces adyuvantes distintos de los de Freund (v.g., el adyuvante RIBI). Adicionalmente, se ha encontrado que son altamente inmunógenas células enteras en ausencia de adyuvantes. La respuesta inmunitaria puede monitorizarse a lo largo del curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen por sangrías retroorbitales. El plasma puede cribarse por ELISA (como se describe más adelante), y los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina anti-B7-H4 humana pueden

utilizarse para fusiones. Los ratones pueden reforzarse intravenosamente con antígeno, por ejemplo 3 días antes del sacrificio y extirpación del bazo. Se cree que puede ser necesario realizar 2-3 fusiones para cada inmunización. Se inmunizan típicamente entre 6 y 24 ratones por cada antígeno. Usualmente se utilizan las variedades HCo7 y HCo12. Adicionalmente, pueden generarse transgenes HCo7 y HCo12 juntos en un solo ratón que tenga dos transgenes de cadena pesada humana diferentes (HCo7/HCo12). Como alternativa o adicionalmente, puede utilizarse la variedad de Ratón KM®.

Generación de Hibridomas que Producen Anticuerpos Monoclonales Humanos de la Invención

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de esta descripción, pueden aislarse esplenocitos y/o células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse a una línea de células inmortalizada apropiada, tal como una línea de células de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden cribarse respecto a la producción de anticuerpos específicos del antígeno. Por ejemplo, suspensiones de células simples de linfocitos esplénicos procedentes de ratones inmunizados pueden fusionarse a un sexto del número de células de mieloma de ratón P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) no secretantes con 50% de PEG. Como alternativa, la suspensión de células simples de linfocitos esplénicos procedentes de ratones inmunizados puede fusionarse utilizando un método de electrofusión basado en campo

eléctrico, utilizando un electroporador de fusión de células en cámara grande CytoPulse (CytoPulse Sciences, Inc., Glen Burnie Maryland). Las células se extienden en placas a aproximadamente 2 x 10^5 en placas de microtitulación con fondo plano, seguido por una incubación de 2 semanas en medio selectivo que contiene 20% de Suero de Clon Fetal, 18% de medio acondicionado "653", 5% Origén (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente 2 semanas, las células pueden cultivarse en un medio en el cual el HAT se reemplaza con HT. Los pocillos individuales pueden cribarse luego por ELISA respecto a anticuerpos humanos monoclonales IgM e IgG. Una vez que se produce el crecimiento extenso de hibridoma, puede observarse el medio usualmente al cabo de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos pueden extenderse luego nuevamente en placas, cribarse una vez más, y si son todavía positivos respecto a IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables pueden cultivarse luego *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejidos para caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en matraces de centrífuga de 2 litros para la purificación de anticuerpos

monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía por afinidad con proteína A-sepharosa (Pharmacia, Piscataway, N.J.). La IgG eluida puede comprobarse por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para asegurar su pureza. La solución tampón puede intercambiarse en PBS, y la concentración puede determinarse por DO280 utilizando el coeficiente de extinción 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en partes alícuotas y almacenarse a -80°C.

Generación de Transfectomas que Producen los Anticuerpos Monoclonales de la Invención

Los anticuerpos de esta descripción pueden producirse también en un transfectoma de células hospedadoras utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de DNA recombinante y métodos de transfección de genes como es bien conocido en la técnica (*v.g.*, Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, pueden obtenerse DNAs que codifican cadenas ligera y pesada parciales o de longitud total, por técnicas estándar de biología molecular (*v.g.*, amplificación por PCR o clonación de cDNA utilizando un hibridoma que expresa el anticuerpo de interés) y los DNAs pueden insertarse en vectores de expresión de tal modo que los genes estén enlazados operativamente por secuencias de control de transcripción y traducción. En este contexto, debe entenderse que el término "enlazado operativamente"

significa que un gen de anticuerpo está ligado a un vector de tal modo que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector sirven para su función propuesta de regulación de la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se seleccionan de modo que sean compatibles con la célula hospedadora de expresión utilizada. El gen de la cadena ligera de anticuerpo y el gen de la cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos estándar (*v.g.*, ligación de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen de anticuerpo y del vector, o ligación de extremos romos si no está presente sitio de restricción alguno). Las regiones variables de la cadena ligera y pesada de los anticuerpos descritos en esta memoria pueden utilizarse para crear genes de anticuerpo de longitud total de cualquier isotipo de anticuerpo por inserción de los mismos en vectores de expresión que codifican ya las regiones constantes de cadena pesada y de cadena ligera del isotipo deseado de tal modo que el segmento V_H está enlazado operativamente al o a los segmentos C_H dentro del vector, y el segmento V_L está enlazado operativamente al segmento C_L dentro del vector. Adicionalmente o como alternativa, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo por una célula hospedadora. El gen de la cadena de anticuerpo puede

clonarse en el vector de tal manera que el péptido señal está enlazado en marco al término amino del gen de la cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal procedente de una proteína distinta de inmunoglobulina).

Además de los genes de la cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de esta descripción llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena de anticuerpo en una célula hospedadora. El término "secuencia reguladora" tiene por objeto incluir promotores, intensificadores y otros elementos de control de la expresión (*v.g.*, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de la cadena de anticuerpos. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Será apreciado por los expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión, con inclusión de la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseado, etc. Secuencias reguladoras preferidas para la expresión de células hospedadoras de mamífero incluyen elementos virales que dirigen niveles altos de expresión de proteína en células de mamífero, tales como promotores y/o intensificadores derivados de citomegalovirus (CMV), el Virus 40 de los

Simios (SV40), adenovirus, *v.g.*, (el promotor tardío mayor de adenovirus (AdMLP) y polioma). Como alternativa, pueden utilizarse secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor ubiquitina o el promotor β-globina. Además, elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tales como el sistema promotor SRα, que contiene secuencias del promotor SV40 temprano y la repetición del terminal largo del virus de la leucemia de las células T humanas tipo 1 (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

Además de los genes de la cadena de anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de esta descripción pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospedadoras (*v.g.*, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospedadoras en las cuales se ha introducido el vector (véanse, *v.g.*, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4399216, 4634665 y 5179017, todas ellas por Axel *et al.*). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedadora en la cual se ha introducido el vector. Genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato-reductasa (DHFR) (para uso en células dhfr-hospedadoras con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección de G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, el o los vectores de expresión que codifican las cadenas pesada y ligera se transfecta(n) en una célula hospedadora por técnicas estándar. Debe entenderse que las diversas formas del término "transfección" abarcan una gran diversidad de técnicas utilizadas comúnmente para la introducción de DNA exógeno en una célula hospedadora procariota o eucariota, *v.g.*, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, etcétera. Aunque teóricamente es posible expresar los anticuerpos de esta descripción en células hospedadoras procariotas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y más preferiblemente células hospedadoras de mamífero, es la más preferida debido a que tales células eucariotas, y en particular las células de mamífero, se ensamblan más probablemente que las células procariotas y secretan un anticuerpo plegado adecuadamente e inmunológicamente activo. Se ha informado que la expresión de genes de anticuerpos en procariotas es ineficaz para la producción de rendimientos elevados de anticuerpo activo (Boss, M.A. y Wood, C.R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13).

Células hospedadoras de mamífero preferidas para expresión de los anticuerpos recombinantes de esta descripción incluyen Células de Ovario de Hámster Chino (CHO) (con inclusión de células dhfr$^-$ CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:4216-4220, utilizadas con un marcador DHFR seleccionable, *v.g.*, como

se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *J. Mol. Biol.* 159:601-621), células NSO de mieloma, células COS y células SP2. En particular, para uso con células NSO de mieloma, otro sistema de expresión preferido es el sistema de expresión de gen GS descrito en WO 87/04462 (otorgada a Wilson), WO 89/01036 (otorgada a Bebbington) y EP 338841 (otorgada a Bebbington). Cuando se introducen vectores de expresión que codifican genes de anticuerpos en células hospedadoras de mamífero, los anticuerpos se producen por cultivo de las células hospedadoras durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células hospedadoras o, más preferiblemente, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual se cultivan las células hospedadoras. Los anticuerpos pueden recuperarse a partir del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteínas estándar.

Caracterización de la Fijación del Anticuerpo al Antígeno

Los anticuerpos de la invención pueden testarse respecto a la fijación a B7-H4 humana por ejemplo por ELISA estándar. Resumidamente, se recubren placas de microtitulación con la proteína B7-H4 purificada y/o recombinante (*v.g.*, una proteína de fusión B7-H4 como se describe en el Ejemplo 1) a 1 µg/ml en PBS, y se bloquean luego con seroalbúmina bovina al 5% en PBS. Se añaden a cada pocillo diluciones del anticuerpo (*v.g.*, diluciones de plasma de ratones inmunizados con B7-H4), y se incuban durante 1-2 horas a 37°C. Se lavan las placas con PBS/Tween y se incuban luego con reactivo secundario (*v.g.*, para anticuerpos humanos, un

reactivo policlonal de IgG de cabra anti-IgG humana, específico de Fc) conjugado a fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C. Después de lavado, se revelan las placas con sustrato pNPP (1 mg/ml), y se analizan a DO de 405-650. Preferiblemente, se utilizarán para las fusiones ratones que desarrollan los títulos más altos.

Un ensayo ELISA como se ha descrito arriba puede utilizarse también para cribar respecto a hibridomas que exhiben reactividad positiva con una proteína B7-H4. Los hibridomas que se fijan con avidez y/o afinidad altas a una proteína B7-H4 se subclonan y se caracterizan ulteriormente. Un clon de cada hibridoma, que retiene la reactividad de las células parentales (por ELISA), puede seleccionarse para producir un banco de 5-10 viales de células almacenado a -140°C y para purificación de anticuerpos.

Para purificar los anticuerpos anti-B7-H4, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en matraces de centrifugación de 2 litros para purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). La IgG eluida puede comprobarse por electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución a fin de asegurar la pureza. La solución tampón puede cambiarse en PBS, y la concentración puede determinarse por DO280 utilizando el coeficiente de extinción 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en partes alícuotas y guardarse a -80°C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-B7-H4 seleccionados se fijan a epítopes únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse utilizando reactivos disponibles comercialmente (Pierce, Rockford, IL). Estudios de competición utilizando anticuerpos monoclonales sin marcar y anticuerpos monoclonales biotinilados pueden realizarse utilizando placas ELISA recubiertas con proteína B7-H4 como se ha descrito arriba. La fijación de mAb biotinilado puede detectarse con una sonda de estreptavidina-fosfatasa alcalina.

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden realizarse ELISAs isotipo utilizando reactivos específicos para anticuerpos de un isotipo particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo monoclonal humano, pueden recubrirse pocillos de placas de microtitulación con 1 µg/ml de inmunoglobulina antihumana durante una noche a 4°C. Después de bloqueo con BSA al 1%, se hacen reaccionar las placas con 1 µg/ml o menos de anticuerpos monoclonales de test o controles isotipo purificados, a la temperatura ambiente durante una a dos horas. Los pocillos pueden hacerse reaccionar luego con IgG1 humana o sondas conjugadas IgM humana-fosfatasa alcalina específica. Las placas se revelan y se analizan como se ha descrito arriba.

Las IgGs humanas anti-B7-H4 pueden testarse ulteriormente en cuanto a reactividad con un antígeno B7-H4 por

transferencia Western. Resumidamente, puede prepararse una proteína B7-H4 y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se bloquean con suero de ternero fetal al 10%, y se sondan con los anticuerpos monoclonales a testar. La fijación de IgG humana puede detectarse utilizando fosfatasa alcalina anti-IgG humana y revelarse con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO.).

La especificidad de fijación de un anticuerpo de esta descripción puede determinarse también por monitorización de la fijación del anticuerpo a células que expresan una proteína B7-H4, por ejemplo por citometría de flujo. Pueden utilizarse células o líneas de células que expresan naturalmente la proteína B7-H4, tales como células OVCAR3, NCI-H226, CFPAC-1 o KB (descrias ulteriormente en el Ejemplo 3), o una línea de células, tal como una línea de células CHO, puede transfectarse con un vector de expresión que codifica B7-H4 de tal modo que se expresa B7-H4 en la superficie de las células. La proteína transfectada puede comprender un marcador, tal como un marcador myc o un marcador his, preferiblemente en el término N, para detección utilizando un anticuerpo para el marcador. La fijación de un anticuerpo de esta descripción a una proteína B7-H4 puede determinarse por incubación de las células transfectadas con el anticuerpo, y detección del anticuerpo fijado. La fijación de un anticuerpo al marcador

en la proteína transfectada puede utilizarse como control positivo.

Moléculas Biespecíficas

En otro aspecto, la presente descripción caracteriza moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-B7-H4, o un fragmento del mismo, de esta descripción. Un anticuerpo de esta descripción, o porciones de fijación de antígeno del mismo, puede derivatizarse o enlazarse a otra molécula funcional, *v.g.*, otro péptido o proteína (*v.g.*, otro anticuerpo o ligando para un receptor) a fin de generar una molécula biespecífica que se fija a al menos dos sitios de fijación o moléculas diana diferentes. El anticuerpo de esta descripción puede derivatizarse de hecho o enlazarse a más de una molécula funcional distinta para generar moléculas multiespecíficas que se fijan a más de dos sitios de fijación diferentes y/o moléculas diana; tales moléculas multiespecíficas deben considerarse también abarcadas por el término "molécula biespecífica" como se utiliza en esta memoria. Para crear una molécula biespecífica de esta descripción, un anticuerpo de esta descripción puede enlazarse funcionalmente (*v.g.*, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u otro modo) a una o más moléculas de fijación distintas, tales como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido o mimético de fijación, de tal modo que resulta una molécula biespecífica.

De acuerdo con ello, la presente descripción incluye moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de fijación para B7-H4 y una segunda especificidad de fijación para un segundo epítope diana. En una realización particular de esta descripción, el segundo epítope diana es un receptor Fc, *v.g.*, FcγRI humano (CD64) o un receptor Fcα humano (CD89). Por ello, esta descripción incluye moléculas biespecíficas capaces de fijarse tanto a células efectoras que expresan FcγR o FcαR (*v.g.*, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMNs)), y a células diana que expresan la proteína B7-H4. Estas moléculas biespecíficas están direccionadas a células que expresan B7-H4 a la célula efectora y desencadenan actividades de célula efectora mediadas por el receptor Fc, tales como fagocitosis de las células que expresan B7-H4, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), liberación de citoquinas, o generación de anión superóxido.

En una realización de esta descripción en la cual la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede incluir adicionalmente una tercera especificidad de fijación, además de una especificidad de fijación anti-Fc y una especificidad de fijación anti-B7-H4. En una realización, la tercera especificidad de fijación es una porción antifactor de intensificación (EF), *v.g.*, una molécula que se fija a una proteína de la superficie implicada en actividad citotóxica y por consiguiente aumenta la respuesta inmunitaria contra la célula diana. La

"porción antifactor de intensificación" puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se fija a una molécula dada, *v.g.*, un antígeno o un receptor, y da por tanto como resultado una intensificación del efecto de los determinantes de fijación para el receptor Fc o el antígeno de la célula diana. La "porción antifactor de intensificación" puede fijarse a un receptor Fc o un antígeno de la célula diana. Como alternativa, la porción antifactor de intensificación puede fijarse a una entidad que es diferente de la entidad a la cual se fijan las especificidades de fijación primera y segunda. Por ejemplo, la porción antifactor de intensificación puede fijarse a una célula T citotóxica (*v.g.*, por la vía de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmune que da como resultado una respuesta inmunitaria incrementada contra la célula diana).

En una realización, las moléculas biespecíficas de esta descripción comprenden como especificidad de fijación al menos un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, con inclusión, *v.g.*, de un Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, Fd, dAb o un Fv monocatenario. El anticuerpo puede ser también un dímero de cadena ligera o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o un constructo monocatenario como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4946778 otorgada a Ladner *et al.*, cuyo contenido se incorpora expresamente por referencia.

En una realización, la especificidad de fijación para un receptor Fcγ es proporcionada por un anticuerpo monoclonal, cuya fijación no es bloqueada por la inmunoglobulina G humana (IgG). Como se utiliza en esta memoria, el término "receptor IgG" hace referencia a cualquiera de los 8 genes de cadena γ localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de 12 isoformas de receptor transmembranales o solubles que están agrupadas en 3 clases de receptores Fcγ: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y FcγRIII (CD16). En una realización preferida, el receptor Fcγ tiene un receptor FcγRI humano de afinidad alta. El receptor FcγRI humano es una molécula de 72 kDa, que exhibe afinidad alta para IgG monómera (10^8-10^9 M^{-1}).

La producción y caracterización de ciertos anticuerpos monoclonales anti-FCγ preferidos se describen en la publicación PCT WO 88/00052 y en la Patente de los Estados Unidos No. 4954617 otorgada a Fanger *et al.*, cuyas doctrinas se incorporan totalmente por referencia en esta memoria. Estos anticuerpos se fijan a un epítope de FcγRI, FcγRII o FcγRIII en un sitio que es distinto del sitio de fijación de Fcγ del receptor y, por tanto, su fijación no es bloqueada sustancialmente por los niveles fisiológicos de IgG. Anticuerpos específicos anti-FCγRI útiles en esta descripción son mAb22, mAb32, mAb44, mAb62 y mAb197. El hibridoma que produce mAb32 está disponible de la American Type Culture Collection, ATCC, No. de Acceso HB9469. En otras realizaciones, el anticuerpo receptor anti-Fcγ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La

producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F. *et al.* (1995) *J. Immunol* 155(10):4996-5002 y publicación PCT WO 94/10332 otorgada a Tempest *et al.* La línea de células productoras del anticuerpo H22 fue depositada en la American Type Culture Collection bajo la designación HA022CL1 y tiene el número de acceso CRL 11177.

En otras realizaciones preferidas adicionales, la especificidad de fijación para un receptor Fc es proporcionada por un anticuerpo que se fija a un receptor IgA humano, *v.g.*, un receptor Fc-alfa (FcαRI (CD89)), cuya fijación preferiblemente no es bloqueada por la inmunoglobulina A humana (IgA). Debe entenderse que el término "receptor IgA" incluye el producto génico de un gen α (FcαRI) localizado en el cromosoma 19. Es sabido que este gen codifica varias isoformas transmembranales remodeladas como alternativa de 55 a 110 kDa. FcαRI (CD89) se expresa constitutivamente en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. FcαRI tiene afinidad media ($\approx 5 \times 10^7$ M^{-1}) tanto para IgA1 como para IgA2, que se incrementa por exposición a citoquinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. *et al.* (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de FcαRI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que fijan FCαRI fuera del dominio de fijación del ligando IgA (Monteiro, R.C. *et al.* (1992) *J. Immunol* 148:1764).

FcαRI y FcγRI son receptores de desencadenamiento preferidos para uso en las moléculas biespecíficas de esta descripción debido a que (1) se expresan primariamente en células efectoras inmunes, *v.g.*, monocitos, PMNs, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a niveles altos (*v.g.*, 5.000-100.000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (*v.g.*, ADCC, fagocitosis); y (4) median la presentación de antígenos incrementada por antígenos, con inclusión de auto-antígenos, direccionados a ellos.

Si bien se prefieren anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que pueden emplearse en las moléculas biespecíficas de esta descripción son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas de la presente descripción pueden prepararse por conjugación de las especificidades de fijación constituyentes, *v.g.*, las especificidades de fijación anti-FcR y anti-B7-H4, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de fijación de la molécula biespecífica puede generarse por separado y conjugarse luego unas a otras. Cuando las especificidades de fijación son proteínas o péptidos, pueden utilizarse una diversidad de agentes de acoplamiento o reticulación para conjugación covalente. Ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilenodimaleimida

(oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (véase *v.g.*, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83, y Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, disponibles ambos de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de fijación son anticuerpos, los mismos pueden conjugarse por enlace sulfhidrilo de las regiones bisagra del término C de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región bisagra está modificada para contener un número impar de residuos sulfhidrilo, preferiblemente uno, antes de la conjugación.

Como alternativa, ambas especificidades de fijación pueden estar codificadas en el mismo vector y expresadas y ensambladas en la misma célula hospedadora. Este método es particularmente útil en el caso en que la molécula biespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x $F(ab')_2$ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica de esta descripción puede ser una molécula monocatenaria que comprende un anticuerpo monocatenario y un determinante de fijación, o una molécula biespecífica monocatenaria que comprende dos determinantes de fijación.

Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas monocatenarias. Métodos para preparación de moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en las Patentes de los Estados Unidos Números 5.260.203; 5.455.030; 4.881.175; 5.132.405; 5.091.513; 5.476.786; 5.013.653; 5.258.498; y 5.482.858, todas las cuales se incorporan expresamente en esta memoria por referencia.

La fijación de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse mediante, por ejemplo, el ensayo de inmunosorbente unido a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo (*v.g.*, inhibición del crecimiento), o ensayo de transferencia Western. Cada uno de estos ensayos detecta por regla general la presencia de complejos proteína-anticuerpo de interés particular por empleo de un reactivo marcado (*v.g.*, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos FcR-anticuerpo pueden detectarse utilizando *v.g.*, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a enzima que reconoce y se fija específicamente a los complejos anticuerpo-FcR. Como alternativa, los complejos pueden detectarse utilizando cualquiera de una diversidad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radiactivamente y utilizarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo de 1986, que se incorpora por referencia en esta memoria). El isótopo radiactivo puede detectarse por medios tales

como el uso de un contador γ o un contador de centelleo o por autorradiografía.

Conjugados

En los conjugados de esta invención, la molécula asociada se conjuga a un anticuerpo por un enlazador químico (al que se hace referencia a veces en esta memoria simplemente como "enlazador"). La molécula asociada puede ser un agente terapéutico o un identificador. El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, una citotoxina, un fármaco no citotóxico (*v.g.*, un inmunosupresor), un agente radiactivo, otro anticuerpo, o una enzima. Preferiblemente, la molécula asociada es una citotoxina. El identificador puede ser cualquier marcador que genera una señal detectable, tal como un radiomarcador, un marcador fluorescente, o una enzima que cataliza una modificación detectable a un sustrato. El anticuerpo desempeña una función de direccionamiento: por fijación a un tejido o célula diana donde se encuentra su antígeno, el anticuerpo conduce el conjugado al tejido o célula diana. En dicho lugar, se escinde el enlazador, liberando la molécula asociada para realizar su función biológica deseada.

La relación de moléculas asociadas fijadas a un anticuerpo puede variar, dependiendo de factores tales como la cantidad de molécula asociada empleada durante la reacción de conjugación y las condiciones experimentales. Preferiblemente, la relación de moléculas asociadas a anticuerpo está comprendida entre 1 y 3, más

preferiblemente entre 1 y 1,5. Los expertos en la técnica apreciarán que, si bien cada molécula individual de anticuerpo Z está conjugada a un número entero de moléculas asociadas, el análisis de una preparación del conjugado puede arrojar como resultado una relación no entera de moléculas diana a anticuerpo, reflejando una media estadística.

Enlazadores

En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador peptidilo, representado en esta memoria como $(L^4)_p$-F-$(L^1)_m$. Otros enlazadores incluyen enlazadores hidrazina y disulfuro, representados en esta memoria como $(L^4)_p$-H-$(L^1)_m$ y $(L^4)_p$-J-$(L^1)_m$, respectivamente. F, H, y J son restos peptidilo, hidrazina y disulfuro, respectivamente, que son escindibles para liberar la molécula asociada del anticuerpo, mientras que L^1 y L^4 son grupos enlazadores. F, H, J, L^1 y L^4 se definen con mayor detalle más adelante en esta memoria, junto con los subíndices p y m. La preparación y el uso de estos y otros enlazadores se describen en el documento WO 2005/112919, cuya descripción se incorpora en esta memoria por referencia.

El uso de peptidilo y otros enlazadores en conjugados anticuerpo-compuesto asociado se describe en las Patentes de los Estados Unidos 2006/0004081; 2006/0024317; 2006/0247295; 6.989.452; 7.087.600; y 7.129.261; WO 2007/051081; 2007/038658; 2007/059404; y 2007/089100; todos los cuales se incorporan en esta memoria por referencia.

Enlazadores adicionales se describen en las Patentes de los Estados Unidos 6.214.345; 2003/0096743; y 2003/0130189; de Groot *et al.*, J. Med. Chem. 42, 5277 (1999); de Groot *et al.* J. Org. Chem. 43, 3093 (2000); de Groot *et al.*, J. Med. Chem. 66, 8815, (2001); WO 02/083180; Carl *et al.*, J. Med. Chem. Lett. 24, 479, (1981); Dubowchik *et al.*, Bioorg & Med. Chem. Lett. 8, 3347 (1998), cuyas descripciones se incorporan en esta memoria por referencia.

Además de conectar el anticuerpo y la molécula asociada, un enlazador puede impartir estabilidad a la molécula asociada, reducir su toxicidad *in vivo*, o afectar favorablemente de cualquier otro modo a su farmacocinética, biodisponibilidad y/o farmacodinámica. Generalmente se prefiere que el enlazador se escinda, liberando la molécula asociada, una vez que el conjugado se ha llevado a su sitio de acción. También preferiblemente, los enlazadores carecen de huella, de tal modo que una vez escindido, no queda huella alguna de la presencia del enlazador.

En otra realización, los enlazadores se caracterizan por su capacidad para escindirse en un sitio en o cerca de una célula diana, tal como en el sitio de acción terapéutica o actividad identificadora de la molécula asociada. Dicha escisión puede ser de naturaleza enzimática. Esta característica ayuda a reducir la activación sistémica de la molécula asociada, reduciendo la toxicidad y los efectos sistémicos secundarios. Grupos escindibles preferidos para

la escisión enzimática incluyen enlaces peptídicos, enlaces éster, y enlaces disulfuro, tales como los restos F, H, y J mencionados anteriormente. En otras realizaciones, los enlazadores son sensibles al pH y se escinden por cambios en el pH.

Un aspecto importante es la capacidad para controlar la velocidad con la cual se escinden los enlazadores. A menudo se desea un enlazador que se escinda rápidamente. En algunas realizaciones, sin embargo, puede preferirse un enlazador que se escinda más lentamente. Por ejemplo, en una formulación de liberación sostenida o en una formulación que posea a la vez un componente de liberación rápida y un componente de liberación lenta, puede ser útil proporcionar un enlazador que se escinda más lentamente. El documento WO 2005/112919 citado anteriormente describe enlazadores hidrazina que pueden diseñarse para escindirse a una gama de velocidades, desde muy rápidas a muy lentas.

Los enlazadores pueden servir también para estabilizar la molécula asociada contra la degradación mientras el conjugado se encuentra en circulación, antes que el mismo alcance el tejido o la célula diana. Esto representa una ventaja importante dado que prolonga la semivida de circulación de la molécula asociada. El enlazador sirve también para atenuar la actividad de la molécula asociada a fin de que el conjugado sea relativamente benigno mientras está en circulación, pero la molécula asociada produce el efecto deseado - por ejemplo es citotóxica - después de la

activación en el sitio de acción deseado. Para conjugados de agentes terapéuticos, esta característica del enlazador sirve para mejorar el índice terapéutico del agente.

Además de los grupos escindibles péptido, hidrazina o disulfuro, F, H, o J, respectivamente, se introducen opcionalmente uno o más grupos enlazadores L^1 entre la molécula asociada y F, H, o J, según sea el caso. Estos grupos enlazadores L^1 pueden describirse también como grupos espaciadores y contienen al menos dos grupos funcionales. Dependiendo del valor del subíndice m (es decir, el número de grupos L^1 presentes) y de la localización de un grupo L^1 particular, una funcionalidad química de un grupo L^1 puede unirse a una funcionalidad química de la molécula asociada, de F, H o J, según sea el caso, o de otro grupo enlazador L^1 (si está presente más de un L^1). Ejemplos de funcionalidades químicas adecuadas para grupos espaciadores L^1 incluyen grupos hidroxi, mercapto, carbonilo, carboxi, amino, cetona, aldehído, y mercapto.

Los enlazadores L^1 pueden ser un grupo alquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, heteroarilo sustituido o insustituido o heteroalquilo sustituido o insustituido. En una realización, los grupos alquilo o arilo pueden comprender entre 1 y 20 átomos de carbono. Los mismos pueden comprender también un resto polietilenglicol.

Grupos L^1 ilustrativos incluyen, por ejemplo, 6-aminohexanol, 6-mercaptohexanol, ácido 10-hidroxidecanoico,

glicina y otros aminoácidos, 1,6-hexanodiol, β-alanina, 2-aminoetanol, cisteamina (2-aminoetanotiol), ácido 5-aminopentanoico, ácido 6-aminohexanoico, ácido 3-maleimidobenzoico, ftalida, ftalidas α-sustituidas, el grupo carbonilo, ésteres aminales, ácidos nucleicos, péptidos y análogos.

Una función de los grupos L^1 es proporcionar separación espacial entre F, H o J, según sea el caso, y la molécula asociada, para que la última no interfiera (*v.g.*, por efectos estéricos o electrónicos) con la química de escisión en F, H, o J. Los grupos L^1 pueden servir también para introducir masa molecular y funcionalidad química adicionales en el conjugado. Generalmente, la masa y funcionalidad adicionales afectan a la semivida en suero y otras propiedades del conjugado. Así, por una selección cuidadosa de los grupos espaciadores, pueden producirse conjugados con una gama de semividas en suero. Opcionalmente, uno o más enlazadores L^1 puede ser un grupo autosacrificable, como se describe más adelante en esta memoria.

El subíndice m es un número entero seleccionado de 0, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Cuando están presentes grupos L^1 múltiples, los mismos pueden ser iguales o diferentes.

L^4 es un resto enlazador que proporciona separación espacial entre F, H, o J, según sea el caso, y el anticuerpo, para que F, H, o J no interfieran con la

fijación del antígeno por el anticuerpo o el anticuerpo interfiera con la química de escisión en F, H, o J. Preferiblemente, L^4 imparte propiedades de solubilidad incrementada o agregación disminuida a los conjugados utilizando un enlazador que contiene el resto o modifica la tasa de hidrólisis del conjugado. Como en el caso de L^1, L^4 es opcionalmente grupo autosacrificable. En una realización, L^4 es alquilo sustituido, alquilo insustituido, arilo sustituido, arilo insustituido, heteroalquilo sustituido, o heteroalquilo insustituido, cualquiera de los cuales puede ser lineal, ramificado o cíclico. Las sustituciones pueden ser, por ejemplo, un alquilo inferior (C_1-C_6), alcoxi, alquiltio, alquilamino, o dialquilamino. En ciertas realizaciones, L^4 comprende un resto no cíclico. En otra realización, L^4 comprende un polímero de aminoácido cargado positiva o negativamente, tal como una polilisina o poliarginina. L^4 puede comprender un polímero tal como un resto polietilen-glicol. Adicionalmente, L^4 puede comprender, por ejemplo, a la vez un componente polímero y un resto de molécula pequeña.

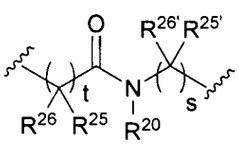
En una realización preferida, L^4 comprende un resto polietilenglicol (PEG). La porción PEG de L^4 puede tener una longitud comprendida entre 1 y 50 unidades. Preferiblemente, el PEG tendrá 1-12 unidades repetitivas, más preferiblemente 3-12 unidades repetitivas, más preferiblemente 2-6 unidades repetitivas o todavía más preferiblemente 3-5 unidades repetitivas, y muy preferiblemente 4 unidades repetitivas. L^4 puede estar

constituido exclusivamente por el resto PEG, o puede contener también un alquilo o heteroalquilo adicional sustituido o insustituido. Es útil combinar PEG como parte del resto L^4 para mejorar la solubilidad en agua del complejo. Adicionalmente, el resto PEG reduce el grado de agregación que puede producirse durante la conjugación del fármaco al anticuerpo.

El subíndice p es 0 ó 1; es decir la presencia de L^4 es opcional. En caso de estar presente, L^4 tiene al menos dos grupos funcionales, estando fijado un grupo funcional a una funcionalidad química en F, H, o J, según sea el caso, y estando fijado el otro grupo funcional al anticuerpo. Ejemplos de funcionalidades químicas adecuadas de grupos L^4 incluyen grupos hidroxi, mercapto, carbonilo, carboxi, amino, cetona, aldehído, y mercapto. Dado que los anticuerpos están conjugados típicamente por grupos sulfhidrilo (*v.g.*, de residuos cisteína no oxidados, la adición de extensiones que contienen sulfhidrilo a residuos lisina con iminotiolano, o la reducción de puentes disulfuro), grupos amino (*v.g.*, procedentes de residuos lisina), grupos aldehído (*v.g.*, procedentes de la oxidación de cadenas laterales glicosídicas), o grupos hidroxilo (*v.g.*, procedentes de residuos serina), las funcionalidades químicas preferidas para fijación al anticuerpo son aquéllas que son reactivas con los grupos que anteceden, siendo ejemplos grupos maleimida, sulfhidrilo, aldehído, hidrazina, semicarbazida y carboxilo. Se prefiere la

combinación de un grupo sulfhidrilo en el anticuerpo y un grupo maleimida en L^4.

En algunas realizaciones, L^4 comprende

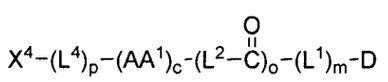


unido directamente al término N de $(AA^1)_c$. R^{20} es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido, y acilo. Cada R^{25}, $R^{25'}$, R^{26} y $R^{26'}$ se selecciona independientemente de H, alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, heteroarilo sustituido o insustituido, y heterocicloalquilo sustituido o insustituido; y s y t son independientemente números enteros de 1 a 6. Preferiblemente, R^{20}, R^{25}, $R^{25'}$, R^{26} y $R^{26'}$ son hidrófobos. En algunas realizaciones, R^{20} es H o alquilo (preferiblemente alquilo inferior insustituido). En algunas realizaciones, R^{25}, $R^{25'}$, R^{26} y $R^{26'}$ son independientemente H o alquilo (preferiblemente alquilo C^1 a C^4 insustituido). En algunas realizaciones, R^{25}, $R^{25'}$, R^{26} y $R^{26'}$ son todos ellos H. en algunas realizaciones, t es 1 y s es 1 ó 2.

Enlazadores peptídicos (F)

Como se ha expuesto anteriormente, los enlazadores peptidilo de la invención pueden representarse por la fórmula general: $(L^4)_p$-F-$(L^1)_m$, donde F representa la porción que comprende el resto peptidilo. En una

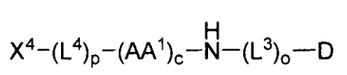
realización, la porción F comprende un enlazador L^2 autosacrificable adicional opcional y un grupo carbonilo, correspondiente a un conjugado de fórmula (a):



En esta realización, L^1, L^4, p, y m son como se ha definido arriba. X^4 es un anticuerpo y D es una molécula asociada. El subíndice o es 0 ó 1 y L^2, en caso de estar presente, representa un enlazador autosacrificable. AA^1 representa uno o más aminoácidos naturales, y/o α-aminoácidos no naturales; c es un número entero de 1 a 20. En algunas realizaciones, c está comprendido en el intervalo de 2 a 5 o c es 2 ó 3.

En la fórmula (a), AA^1 está enlazado, en su término amino, directamente a L^4 o bien, en caso de estar ausente L^4, directamente a X^4. En algunas realizaciones, cuando está presente L^4, L^4 no comprende un grupo acilo carboxílico unido directamente al término N de $(AA^1)_c$.

En otra realización, la porción F comprende un grupo amino y un grupo espaciador L^3 opcional, y L^1 está ausente (es decir, m es 0), correspondiente a un conjugado de fórmula (b):



En esta realización, X^4, D, L^4, AA^1, c, y p son como se ha definido arriba. El subíndice o es 0 ó 1. L^3, si está presente, es un grupo espaciador que comprende un grupo funcional amino primario o secundario o grupo funcional carboxilo, y o bien la amina de L^3 forma un enlace amídico con un grupo funcional carboxilo colgante de D, o el carboxilo de L^3 forma un enlace amida con un grupo funcional amina colgante de D.

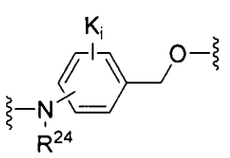
Enlazadores autosacrificables

Un enlazador autosacrificable es un resto químico bifuncional que es capaz de enlazar covalentemente dos restos químicos espaciados en una molécula tripartita normalmente estable, liberando uno de dichos restos químicos espaciados de la molécula tripartita por medio de escisión enzimática; y escindiéndose espontáneamente a continuación de dicha escisión enzimática del resto de la molécula para liberar el otro de dichos restos químicos espaciados. De acuerdo con la presente invención, el espaciador autosacrificable está enlazado covalentemente en uno de sus extremos al resto peptídico y enlazado covalentemente en su otro extremo al sitio químicamente reactivo del resto de fármaco cuya derivatización inhibe la actividad farmacológica, a fin de espaciar y enlazar covalentemente juntos el resto peptídico y el resto de fármaco en una molécula tripartita que es estable y farmacológicamente inactiva en ausencia de la enzima diana, pero que es enzimáticamente escindible por dicha enzima diana en el enlace que une covalentemente el resto

espaciador y el resto peptídico para efectuar de este modo la liberación del resto peptídico de la molécula tripartita. Dicha escisión enzimática, a su vez, activará el carácter autosacrificable del resto espaciador e iniciará la escisión espontánea del enlace que une covalentemente el resto espaciador al resto de fármaco, efectuando de este modo la liberación del fármaco en forma farmacológicamente activa. Véase, por ejemplo, Carl *et al.*, J. Med. Chem., 24 (3), 479-480 (1981); Carl *et al.*, WO 81/01145 (1981); Toki *et al.*, J. Org. Chem. 67, 1866-1872 (2002); Boyd *et al.*, WO 2005/112919; y Boyd *et al.*, WO 2007/038658, cuyas descripciones se incorporan en esta memoria por referencia.

...

Un espaciador autosacrificable particularmente preferido puede representarse por la fórmula (c):



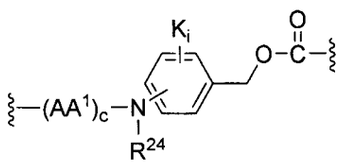
El anillo aromático del grupo aminobencilo puede estar sustituido con uno o más grupos "K". Un grupo "K" es un sustituyente del anillo aromático que reemplaza un hidrógeno unido en caso contrario a uno de los cuatro carbonos insustituidos que forman parte de la estructura del anillo. El grupo "K" puede ser un átomo simple, tal como un halógeno, o puede ser un grupo multiatómico, tal como alquilo, heteroalquilo, amino, nitro, hidroxi, alcoxi,

haloalquilo, y ciano. Cada K se selecciona independientemente del grupo constituido por alquilo sustituido, alquilo insustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo insustituido, arilo sustituido, arilo insustituido, heteroarilo sustituido, hetero-arilo insustituido, heterocicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo insustituido, halógeno, NO_2, $NR^{21}R^{22}$, $NR^{21}COR^{22}$, $OCONR^{21}R^{22}$, $OCOR^{21}$, y OR^{21}, en donde R^{21} y R^{22} se seleccionan independientemente del grupo constituido por H, alquilo sustituido, alquilo insustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo insustituido, arilo sustituido, arilo insustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo insustituido, heterocicloalquilo sustituido y heterocicloalquilo insustituido. Sustituyentes K ilustrativos incluyen, pero sin carácter limitante, F, Cl, Br, I, NO_2, OH, OCH_3, $NHCOCH_3$, $N(CH_3)_2$, $NHCOCF_3$ y metilo. En el caso de "K_i", *i* es un número entero de 0, 1, 2, 3 ó 4. En una realización preferida, *i* es 0.

El átomo de oxígeno del éter de la estructura anterior está conectado a un grupo carbonilo (no representado). La línea que va desde la funcionalidad NR^{24} al anillo aromático indica que la funcionalidad amina puede estar unida a cualquiera de los cinco carbonos que forman a la vez el anillo y no están sustituidos por el grupo $-CH_2-O-$. Con preferencia, la funcionalidad NR^{24} de X está unida covalentemente al anillo aromático en la posición para con relación al grupo $-CH_2-O$. R^{24} es un miembro seleccionado del grupo constituido por H, alquilo sustituido, alquilo

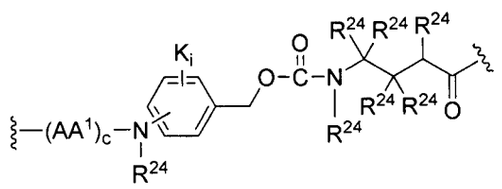
insustituido, heteroalquilo sustituido, y heteroalquilo insustituido. En una realización específica, R^{24} es hidrógeno.

En una realización, la invención proporciona un enlazador peptídico de la fórmula (a) anterior, en donde F comprende la estructura:



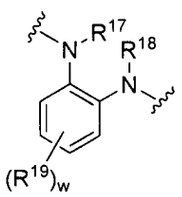
donde R^{24}, AA^1, K, i, y c son como se ha definido arriba.

En otra realización, el enlazador peptídico de la fórmula (a) anterior comprende un $-F-(L^1)_m-$ que comprende la estructura:



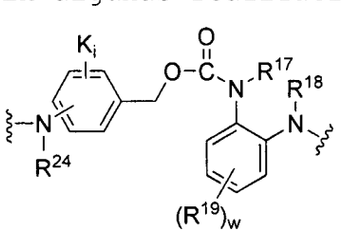
donde R^{24}, AA^1, K, i, y c son como se ha definido arriba.

En algunas realizaciones, un espaciador autosacrificable L^1 o L^2 incluye



donde cada uno de R^{17}, R^{18}, R^{19} se selecciona independientemente de H, alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido y arilo sustituido o insustituido, y w es un número entero de 0 a 4. En algunas realizaciones, R^{17} y R^{18} son independientemente H o alquilo (preferiblemente alquilo C_1-C_4 insustituido). Preferiblemente, R^{17} y R^{18} son alquilo C1-4, tal como metilo o etilo. En algunas realizaciones, w es 0. Se ha encontrado experimentalmente que este espaciador autosacrificable particular se cicla con relativa rapidez.

En algunas realizaciones, L^1 o L^2 incluye

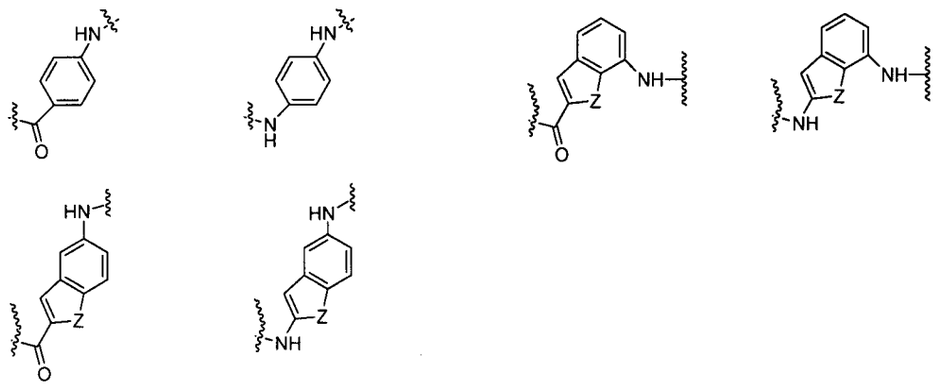


donde R^{17}, R^{18}, R^{19}, R^{24} y K son como se ha definido arriba.

Grupos Espaciadores

El grupo espaciador L^3 se caracteriza porque comprende un grupo funcional amino primario o secundario o carboxilo, y la amina de L^3 forma un enlace amídico con un grupo funcional carboxilo colgante de D, o el carboxilo de L^3

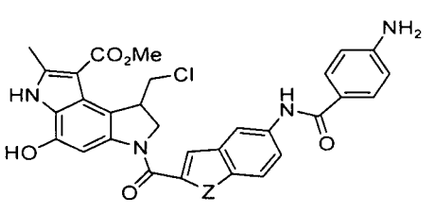
forma un enlace amídico con un grupo funcional amino colgante de D. L^3 puede seleccionarse del grupo constituido por alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, heteroarilo sustituido o insustituido, o heterocicloalquilo sustituido o insustituido. En una realización preferida, L^3 comprende un grupo aromático. Más preferiblemente, L^3 comprende un grupo ácido benzoico, un grupo anilina o un grupo indol. Ejemplos no limitantes de estructuras que pueden servir como un espaciador $-L^3-NH-$ incluyen las estructuras siguientes:

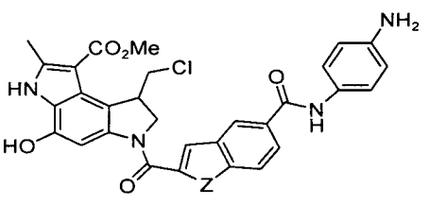


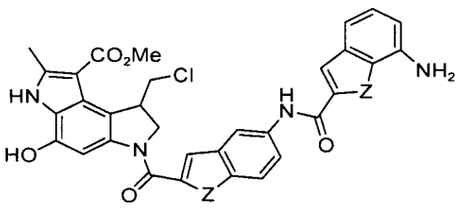
donde Z es un miembro seleccionado de O, S y NR^{23}, y donde R^{23} es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido, y acilo.

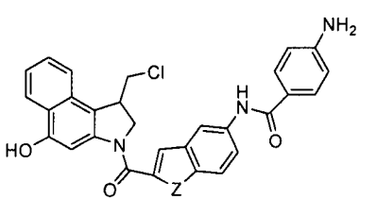
Después de la escisión del enlazador de la invención que contiene L^3, el resto L^3 permanece unido al fármaco, D. de acuerdo con ello, el resto L^3 se selecciona de tal manera

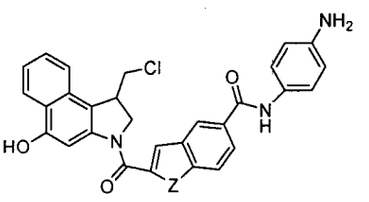
que su fijación a D no altera significativamente la actividad de D. En otra realización, una porción del fármaco D propiamente dicho funciona como el espaciador L^3. Por ejemplo, en una realización, el fármaco, D, es un derivado de duocarmicina, en el cual una porción del fármaco funciona como el espaciador L^3. Ejemplos no limitantes de tales realizaciones incluyen aquéllas en las cuales NH_2-(L^3)-D tiene una estructura seleccionada del grupo constituido por:

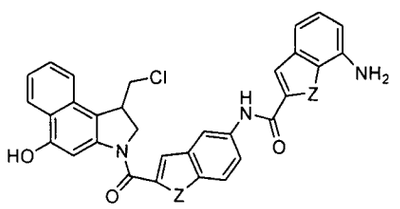










y 

donde Z es O, S o NR^{23}, donde R^{23} es H, alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido, o acilo; y el grupo NH_2 en cada estructura reacciona con $(AA^1)_c$ para formar $-(AA^1)_c-NH-$.

Secuencia del Péptido $(AA^1)_c$

El grupo AA^1 representa un solo aminoácido o una pluralidad de aminoácidos unidos entre sí por enlaces amídicos. Los aminoácidos pueden ser aminoácidos naturales y/o α-aminoácidos no naturales. Los mismos pueden encontrarse en la configuración L o la configuración D. En una realización, se utilizan al menos tres aminoácidos diferentes. En otra realización, se utilizan solamente dos aminoácidos.

El término "aminoácido" hace referencia a aminoácidos existentes naturalmente y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos existentes naturalmente. Aminoácidos existentes naturalmente son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que están modificados posteriormente, *v.g.*, hidroxiprolina, γ-carboxiglutamato, citrulina, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos hace referencia a compuestos que tienen la

misma estructura química básica que un aminoácido existente naturalmente, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, *v.g.*, homoserina, norleucina, metionina-sulfóxido, y metionina-metil-sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (*v.g.*, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido existente naturalmente. Un aminoácido que puede utilizarse en particular es citrulina, que es un precursor de arginina y está implicado en la formación de urea en el hígado. Miméticos de aminoácidos hace referencia a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero funciona de una manera similar a un aminoácido existente naturalmente. El término "aminoácido no natural" tiene por objeto representar la forma estereoquímica "D" de los 20 amino-ácidos existentes naturalmente arriba descrita. Debe entenderse, además, que el término aminoácido no natural incluye homólogos de los aminoácidos naturales, y formas modificadas por síntesis de los aminoácidos naturales. Las formas modificadas por síntesis incluyen, pero sin carácter limitante, aminoácidos que tienen cadenas de alquileno acortadas o alargadas en hasta 2 átomos de carbono, aminoácidos que comprenden grupos arilo opcionalmente sustituidos, y aminoácidos que comprenden grupos halogenados, preferiblemente grupos halogenados alquilo y arilo. Cuando está fijado a un enlazador o conjugado de la invención, el aminoácido se encuentra en la forma de una "cadena lateral de

aminoácido", donde el grupo ácido carboxílico del aminoácido se ha reemplazado con un grupo ceto (C(O)). Así, por ejemplo, una cadena lateral alanina es $-C(O)-CH(NH_2)-CH_3$, etcétera.

La secuencia peptídica $(AA^1)_c$ es funcionalmente el residuo de amidificación de un aminoácido simple (cuando c = 1) o una pluralidad de aminoácidos unidos entre sí por enlaces amídicos. La secuencia peptídica $(AA^1)_c$ se selecciona preferiblemente para la escisión catalizada enzimáticamente por una enzima en un punto de interés de un sistema biológico. Por ejemplo, para conjugados que están direccionados a pero no internalizados en una célula, se selecciona un péptido que es escindido por una proteasa que se encuentra en la matriz extracelular, *v.g.*, una proteasa liberada por células prácticamente moribundas o una proteasa asociada a un tumor, de tal modo que el péptido se escinde extracelularmente. Para los conjugados que están diseñados para internalización por una célula, la secuencia $(AA^1)_c$ se selecciona preferiblemente para escisión por una proteasa endosómica o lisosómica. El número de aminoácidos dentro del péptido puede variar de 1 a 20; pero más preferiblemente existirán 1-8 aminoácidos, 1-6 aminoácidos o 1, 2, 3 ó 4 aminoácidos comprendiendo $(AA^1)_c$. Secuencias de péptidos que son susceptibles de escisión por enzimas o clases de enzimas específicas son bien conocidas en la técnica.

Preferiblemente, $(AA^1)_c$ contiene una secuencia de aminoácidos ("secuencia de reconocimiento de escisión") que es un sitio de escisión por la proteasa. Muchas secuencias de escisión por proteasas se conocen en la técnica. Véase, v.g., Matayoshi *et al. Science* 247: 954 (1990); Dunn *et al. Meth. Enzymol.* 241: 254 (1994); Seidah *et al. Meth. Enzymol.* 244: 175 (1994); Thornberry, *Meth. Enzymol.* 244: 615 (1994); Weber *et al. Meth. Enzymol.* 244: 595 (1994); Smith *et al. Meth. Enzymol.* 244: 412 (1994); Bouvier *et al. Meth. Enzymol.* 248: 614 (1995), Hardy *et al.*, en Amyloid Protein Precursor in Development, Aging, y Alzheimer's Disease, compiladores Masters *et al.* pp. 190-198 (1994).

El péptido incluye típicamente 3-12 (o más) aminoácidos. La selección de aminoácidos particulares dependerá, al menos en parte, de la enzima a utilizar para la escisión del péptido, así como de la estabilidad del péptido *in vivo*. Un ejemplo de un péptido escindible adecuado es β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 27). Éste puede combinarse con un grupo estabilizador para formar succinil-β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 30). Otros ejemplos de péptidos escindibles adecuados se proporcionan en las referencias citadas más adelante. Como alternativa, pueden utilizarse enlazadores que comprenden un solo residuo de aminoácidos, como se describe en WO 2008/103693, cuya descripción se incorpora en esta memoria por referencia.

En una realización preferida, la secuencia del péptido $(AA^1)_c$ se selecciona sobre la base de su susceptibilidad

para ser escindida por una proteasa lisosómica, ejemplos de las cuales incluyen las catepsinas B, C, D, H, L y S. Preferiblemente, la secuencia del péptido $(AA^1)_c$ es susceptible de ser escindida por la catepsina B *in vitro*. Aunque la catepsina B es una proteasa lisosómica, se cree que se encuentra cierta concentración de ella en los tejidos tumorales que rodean la matriz extracelular.

En otra realización, la secuencia peptídica $(AA^1)_c$ se selecciona sobre la base de su susceptibilidad para ser escindida por una proteasa asociada a un tumor, tal como una proteasa encontrada extracelularmente en la vecindad de las células tumorales, ejemplos de las cuales incluyen Thimet-oligopeptidasa (TOP) y CD10. O bien, la secuencia $(AA^1)_c$ se diseña para escisión selectiva por uroquinasa o triptasa.

Como un ejemplo ilustrativo, CD10, conocida también como neprilisina, endopeptidasa neutra (NEP), y antígeno común de la leucemia linfoblástica aguda (CALLA), es una metaloproteasa tipo II de la superficie celular dependiente de cinc. Sustratos escindibles adecuados para uso con CD10 incluyen Leu-Ala-Leu e Ile-Ala-Leu.

Otro ejemplo ilustrativo está basado en metaloproteasas de la matriz (MMP). Probablemente las enzimas proteolíticas mejor caracterizadas asociadas con tumores, existe una correlación clara de activación de MMPs con microentornos tumorales. En particular, las enzimas solubles de la matriz

MMP2 (gelatinasa A) y MMP9 (gelatinasa B), han sido estudiadas intensivamente, y se ha demostrado que son activadas de modo selectivo durante la remodelación tisular, con inclusión del crecimiento tumoral. Secuencias peptídicas diseñadas para ser escindidas por MMP2 y MMP9 han sido diseñadas y testadas respecto a conjugados de dextrano y metotrexato (Chau *et al.*, Bioconjugate Chem. 15:931-941 (2004)); PEG (polietilen-glicol) y doxorrubicina (Bae *et al.*, *Drugs Exp. Clin. Res.* 29:15-23 (2004)); y albúmina y doxorrubicina (Kratz *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11:2001-2006 (2001)). Ejemplos de secuencias adecuadas para uso con MMPs incluyen, pero sin carácter limitante, Pro-Val-Gly-Leu-Ile-Gly (SEQ. ID NO: 21), Gly-Pro-Leu-Gly-Val (SEQ. ID NO: 22), Gly-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-Gln (SEQ. ID NO: 23), Pro-Leu-Gly-Leu (SEQ. ID NO: 24), Gly-Pro-Leu-Gly-Met-Leu-Ser-Gln (SEQ. ID NO: 25), y Gly-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala-Gln (SEQ. ID NO: 26). (Véanse, v.g., las referencias citadas anteriormente así como Kline *et al.*, *Mol. Pharmaceut.* 1:9-22 (2004) y Liu *et al.*, *Cancer Res.* 60:6061-6067 (2000)).

Otro ejemplo adicional son las serina-proteasas transmembranales tipo II. Este grupo de enzimas incluye, por ejemplo, hepsina, testisina, y TMPRSS4. Gln-Ala-Arg es una secuencia sustrato que es útil con matriptasa/MT-SP1 (que se sobre-expresa en los cánceres de mama y ovario) y Leu-Ser-Arg es útil con hepsina (sobre-expresada en tumores de próstata y algunos otros tipos). (Véase, v.g., Lee *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275:36720-36725 y Kurachi y Yamamoto,

Handbook of Proteolytic Enzymes Vol. 2, 2.ª edición (Barrett AJ, Rawlings ND & Woessner JF, compiladores) págs. 1699-1702 (2004)).

Ejemplos adecuados, pero no limitantes, de secuencias peptídicas adecuadas para uso en los conjugados de la invención incluyen Val-Cit, Cit-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-tosyl-Arg, Phe-N^9-nitro-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu, β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 27), Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ. ID NO: 28), Val-Ala, Leu-Leu-Gly-Leu (SEQ ID NO: 29), Leu-Asn-Ala, y Lys-Leu-Val. Secuencias de péptidos preferidas son Val-Cit y Val-Lys.

En otra realización, el aminoácido localizado en la posición más próxima al resto de fármaco se selecciona del grupo constituido por Ala, Asn, Asp, Cit, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, y Val. En otra realización adicional, el aminoácidos localizado en la posición más próxima al resto de fármaco se selecciona del grupo constituido por: Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, y Val.

Una persona con experiencia en la técnica puede evaluar fácilmente una serie de secuencias peptídicas para determinar su utilidad en la presente invención sin recurrir a experimentación excesiva. Véase, por ejemplo,

Zimmerman, M., *et al.*, (1977) *Analytical Biochemistry* 78:47-51; Lee, D., *et al.*, (1999) *Bioorganic y Medicinal Chemistry Letters* 9:1667-72; y Rano, T.A., *et al.*, (1997) *Chemistry y Biology* 4:149-55.

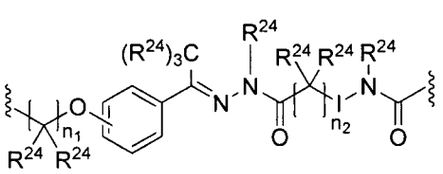
Un conjugado de esta invención puede contener opcionalmente dos o más enlazadores. Estos enlazadores pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, puede utilizarse un enlazador peptidilo para conectar el fármaco al ligando, y un segundo enlazador peptidilo puede unir un agente de diagnóstico al complejo. Otros usos para enlazadores adicionales incluyen enlazar agentes analíticos, biomoléculas, agentes de direccionamiento, y marcadores detectables al complejo anticuerpo-compuesto asociado.

Enlazadores Hidrazina (H)

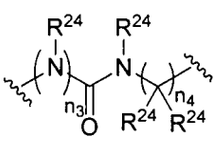
En otra realización, el conjugado de la invención comprende un enlazador autosacrificable de hidrazina, en el cual el conjugado tiene la estructura:

$$X^4-(L^4)_p-H-(L^1)_m-D$$

en donde D, L^1, L^4, p, m, y X^4 son como se define arriba y se describe más adelante en esta memoria, y H es un enlazador que comprende la estructura:



en donde n_1 es un entero de 1 a 10; n_2 es 0, 1, ó 2; cada R^{24} es un miembro seleccionado independientemente del grupo constituido por H, alquilo sustituido, alquilo insustituido, heteroalquilo sustituido, y heteroalquilo insustituido; e I es un enlace (a saber, el enlace entre el carbono de la cadena principal y el nitrógeno adyacente) o:

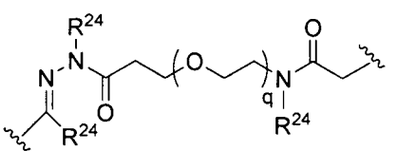


en donde n_3 es 0 ó 1, con la salvedad de que cuando n_3 es 0, n_2 no es 0; y n_4 es 1, 2, ó 3.

En una realización, la sustitución en el anillo fenilo es una sustitución para. En realizaciones preferidas, n_1 es 2, 3, ó 4 o n_1 es 3. En realizaciones preferidas, n_2 es 1. En realizaciones preferidas, I es un enlace (a saber, el enlace entre el carbono de la cadena principal y el nitrógeno adyacente). En un aspecto, el enlazador hidrazina, H, puede formar un enlazador autosacrificable de 6 miembros después de la escisión, por ejemplo, cuando n_3 es 0 y n_4 es 2. En otro aspecto, el enlazador hidrazina, H, puede formar dos enlazadores autosacrificables de 5 miembros después de la escisión. En otros aspectos adicionales, H forma un enlazador autosacrificable de 5 miembros, H forma un enlazador autosacrificable de 7 miembros, o H forma un enlazador autosacrificable de 5 miembros y un enlazador autosacrificable de 6 miembros, después de la escisión. La tasa de escisión se ve afectada por el tamaño del anillo formado después de la escisión.

Así, dependiendo de la tasa de escisión deseada, puede seleccionarse la formación de un tamaño de anillo apropiado después de la escisión.

Otra estructura de hidrazina, H, tiene la fórmula:

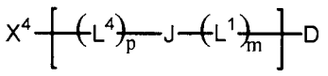


donde q es 0, 1, 2, 3, 4, 5, ó 6; y cada R^{24} es un miembro seleccionado independientemente del grupo constituido por H, alquilo sustituido, alquilo insustituido, heteroalquilo sustituido, y heteroalquilo insustituido. Esta estructura de hidrazina puede formar también anillos de 5, 6, ó 7 miembros y pueden añadirse componentes adicionales para formar anillos múltiples.

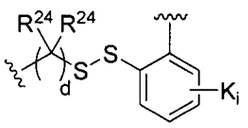
La preparación, la química de escisión y la cinética de ciclación de los diversos enlazadores hidrazina se describen en WO 2005/112919, cuya descripción se incorpora en esta memoria por referencia.

Enlazadores Disulfuro (J)

En otra realización adicional, el enlazador comprende un grupo disulfuro escindible enzimáticamente. En una realización, la invención proporciona un compuesto anticuerpo-compuesto asociado que tiene una estructura de acuerdo con la Fórmula (d):



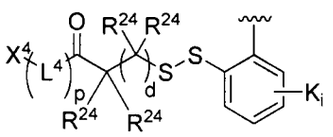
en donde D, L^1, L^4, p, m, y X^4 son como se define arriba y como se describe ulteriormente en esta memoria, y J es un enlazador disulfuro que comprende un grupo que tiene la estructura:



en donde cada R^{24} es un miembro seleccionado independientemente del grupo constituido por H, alquilo sustituido, alquilo insustituido, heteroalquilo sustituido, y heteroalquilo insustituido ; cada K es un miembro seleccionado independientemente del grupo constituido por alquilo sustituido, alquilo insustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo insustituido, arilo sustituido, arilo insustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo insustituido, heterocicloalquilo sustituido, heterocicloalquilo insustituido, halógeno, NO_2, $NR^{21}R^{22}$, $NR^{21}COR^{22}$, $OCONR^{21}R^{22}$, $OCOR^{21}$, y OR^{21} en donde R^{21} y R^{22} se seleccionan independientemente del grupo constituido por H, alquilo sustituido, alquilo insustituido, heteroalquilo sustituido, heteroalquilo insustituido, arilo sustituido, arilo insustituido, heteroarilo sustituido, heteroarilo insustituido, heterocicloalquilo sustituido y heterocicloalquilo insustituido; *i* es un entero de 0, 1, 2, 3, ó 4; y d es un entero de 0, 1, 2, 3, 4, 5, ó 6.

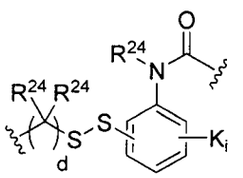
El anillo aromático de un enlazador disulfuro puede estar sustituido con uno o más grupos "K". Un grupo "K" es un sustituyente que reemplaza un hidrógeno unido en caso contrario a uno de los cuatro carbonos insustituidos que forman parte de la estructura del anillo. El grupo "K" puede ser un átomo simple, tal como un halógeno, o puede ser un grupo multiatómico, tal como alquilo, heteroalquilo, amino, nitro, hidroxi, alcoxi, haloalquilo, y ciano. Sustituyentes K ilustrativos incluyen, pero sin carácter limitante, F, Cl, Br, I, NO_2, OH, OCH_3, $NHCOCH_3$, $N(CH_3)_2$, $NHCOCF_3$ y metilo. Para "K_i", *i* es un entero de 0, 1, 2, 3, ó 4. En una realización específica, *i* es 0.

En una realización preferida, el enlazador comprende un grupo disulfuro escindible enzimáticamente de la fórmula siguiente:



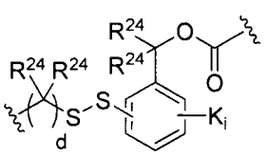
en donde L^4, X^4, p, y R^{24} son como se describe arriba, y d es 0, 1, 2, 3, 4, 5, ó 6. En una realización particular, d es 1 ó 2.

Un enlazador disulfuro más específico se muestra en la fórmula siguiente:



Preferiblemente, d es 1 ó 2 y cada K es H.

Otro enlazador disulfuro se muestra en la fórmula siguiente:



Preferiblemente, d es 1 ó 2 y cada K es H.

En diversas realizaciones, los disulfuros están situados en posición orto respecto a la amina. En otra realización específica, a es 0. En realizaciones preferidas, R^{24} se selecciona independientemente de H y CH_3.

La preparación y utilización de enlazadores disulfuro tales como los arriba descritos se describe en WO 2005/112919, cuya descripción se incorpora en esta memoria por referencia.

Para discusión adicional de tipos de citotoxinas, enlazadores y la conjugación de agentes terapéuticos a anticuerpos, véanse también las Patentes de los Estados

Unidos 7.087.600; 6.989.452; 7.129.261; 2006/0004081; 2006/0247295; WO 02/096910; WO 2007/051081; WO 2005/112919; WO 2007/059404; WO 2008/083312; WO 2008/103693; Saito *et al.* (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail *et al.* (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Payne. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan y Kreitman (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter y Springer (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264, cada uno de los cuales se incorpora en esta memoria por referencia.

Citotoxinas como Moléculas Asociadas

En un aspecto, la presente invención caracteriza un anticuerpo conjugado a una molécula asociada, tal como una citotoxina, un fármaco (*v.g.*, un inmunosupresor) o una radiotoxina. A tales conjugados se hace referencia también como "inmunotoxinas". Una citotoxina o un agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para (*v.g.*, destruya) las células. En esta memoria, "citotoxina" incluye compuestos que se encuentran en forma de profármaco y se convierten in vivo en la especie tóxica real.

Ejemplos de moléculas asociadas de la presente invención incluyen taxol, citochalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracina-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína,

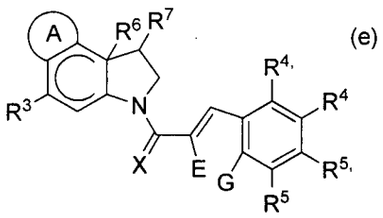
propranolol, y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Ejemplos de moléculas asociadas incluyen también, por ejemplo, antimetabolitos (v.g., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil-descarbazina), agentes alquilantes (v.g., mecloretamina, tioepa-clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, tubulisina, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, cisplatino, antraciclinas (v.g., daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorrubicina), antibióticos (v.g., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes antimitóticos (v.g., vincristina y vinblastina). Otros ejemplos preferidos de moléculas asociadas que pueden conjugarse con un anticuerpo de la invención incluyen calicheamicinas, maytansinas y auristatinas, y derivados de las mismas.

Ejemplos preferidos de moléculas asociadas son análogos y derivados de CC-1065 y las duocarmicinas estructuralmente afines. A pesar de su potente y amplia actividad antitumoral, CC-1065 no puede utilizarse en humanos debido a que causa muerte retardada en animales experimentales, incitando a una búsqueda de análogos o derivados con un mejor índice terapéutico.

Se conocen en la técnica muchos análogos y derivados de CC-1065 y las duocarmicinas. La investigación acerca de la estructura, síntesis y propiedades de muchos de los compuestos ha sido revisada. Véase, por ejemplo, Boger *et*

al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 35: 1438 (1996); y Boger *et al.*, Chem. Rev. 97: 787 (1997). Otras descripciones relativas a análogos o derivados de CC-1065 incluyen: las Patentes de los Estados Unidos 5.101.038; 5.641.780; 5.187.186; 5.070.092; 5.703.080; 5.070.092; 5.641.780; 5.101.038; 5.084.468; 5.739.350; 4.978.757. 5.332.837 y 4.912.227; WO 96/10405; y EP 0.537.575 A1.

En un aspecto particularmente preferido, la molécula asociada es un análogo de CC-1065/duocarmicina que tiene una estructura de acuerdo con la fórmula (e) siguiente:



en la cual el sistema de anillos A es un miembro seleccionado de grupos arilo sustituido o insustituido, heteroarilo sustituido o insustituido y heterocicloalquilo sustituido o insustituido. Sistemas ilustrativos de anillos A incluyen fenilo y pirrol.

Los símbolos E y G se seleccionan independientemente de H, alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido, un heteroátomo, un enlace simple o bien E y G se unen opcionalmente para formar un sistema de anillos seleccionado de arilo sustituido o insustituido,

heteroarilo sustituido o insustituido y heterocicloalquilo sustituido o insustituido.

El símbolo X representa un miembro seleccionado de O, S y NR^{23}. R^{23} es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido, y acilo.

El símbolo R^3 representa un miembro seleccionado de (=O), SR^{11}, NHR^{11} y OR^{11}, en el cual R^{11} es H, alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido, monofosfatos, difosfatos, trifosfatos, sulfonatos, acilo, $C(O)R^{12}R^{13}$, $C(O)OR^{12}$, $C(O)NR^{12}R^{13}$, $P(O)(OR^{12})_2$, $C(O)CHR^{12}R^{13}$, SR^{12} o $SiR^{12}R^{13}R^{14}$. Los símbolos R^{12}, R^{13} y R^{14} representan independientemente H, alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido y arilo sustituido o insustituido, donde R^{12} y R^{13} junto con el átomo de nitrógeno o carbono al cual están unidos se unen opcionalmente para formar un sistema de anillos heterocicloalquilo sustituido o insustituido que tiene 4 a 6 miembros, que contienen opcionalmente dos o más heteroátomos.

R^4, $R^{4'}$, R^5 y $R^{5'}$ son miembros seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, heteroarilo sustituido o insustituido, heterocicloalquilo sustituido o insustituido, halógeno, NO_2, $NR^{15}R^{16}$, $NC(O)R^{15}$, $OC(O)NR^{15}R^{16}$, $OC(O)OR^{15}$, $C(O)R^{15}$, SR^{15}, OR^{15}, $CR^{15}=NR^{16}$, y $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$, donde n es un

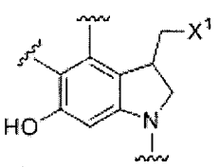
número entero de 1 a 20, o cualquier par adyacente de R^4, $R^{4'}$, R^5 y $R^{5'}$, junto con los átomos de carbono a los cuales están unidos, se unen para formar un sistema de anillos cicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido o insustituido que tiene de 4 a 6 miembros. R^{15} y R^{16} representan independientemente H, alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, heteroarilo sustituido o insustituido, heterocicloalquilo sustituido o insustituido y peptidyl sustituido o insustituido, donde R^{15} y R^{16}, junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos se unen opcionalmente para formar un sistema de anillos heterocicloalquilo sustituido o insustituido que tiene de 4 a 6 miembros que contienen opcionalmente dos o más heteroátomos. Una estructura ilustrativa es anilina.

Uno de R^3, R^4, $R^{4'}$, R^5 y $R^{5'}$ une la citotoxina a un enlazador o sustrato enzimáticamente escindible de la presente invención, como se describe en esta memoria, por ejemplo a L^1 o L^3, si está presente, o a F, H, o J.

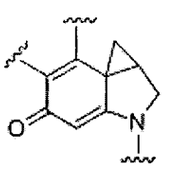
R^6 es un enlace simple que está presente o ausente. Cuando R^6 está presente, R^6 y R^7 se unen para formar un anillo ciclopropilo. R^7 es CH_2-X^1 o -CH_2-. Cuando R^7 es -CH_2-, el mismo es un componente del anillo ciclopropano. El símbolo X^1 representa un grupo lábil tal como un halógeno, por ejemplo Cl, Br o F. Las combinaciones de R^6 y R^7 se interpretan de una manera que no viole los principios de la valencia química.

X^1 puede ser cualquier grupo lábil. Grupos hábiles útiles incluyen, pero sin carácter limitante, halógenos, azidas, ésteres sulfónicos (v.g., alquilsulfonilo, arilsulfonilo), iones oxonio, alquil-percloratos, ésteres amonioalcanosulfonato, alquilfluorosulfonatos y compuestos fluorados (*v.g.*, triflatos, nonaflatos, tresilatos) y análogos. Halógenos particulares útiles como grupos hábiles son F, Cl y Br.

La línea curva dentro del anillo de 6 miembros indica que el anillo puede tener uno o más grados de insaturación, y puede ser aromático. Así, estructuras de anillo tales como las indicadas a continuación, y estructuras afines, están dentro del alcance de la fórmula (f):

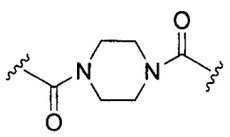


y

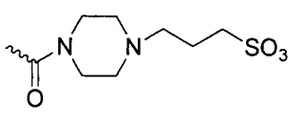
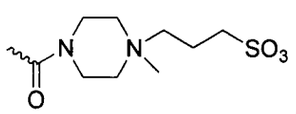
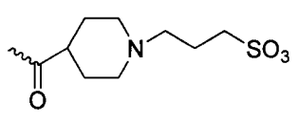


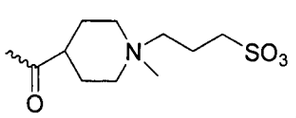
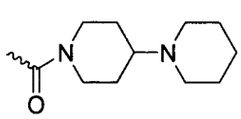
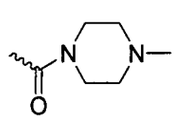
(f)

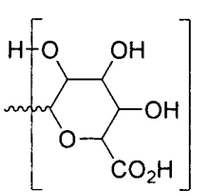
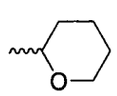
En una realización, R^{11} incluye un resto, X^5, que no se cicla en sí mismo y enlaza el fármaco a L^1 o L^3, si está presente, o a F, H, o J. El resto, X^5, es preferiblemente escindible utilizando una enzima y, cuando se escinde, proporciona el fármaco activo. Como un ejemplo, R^{11} puede tener la estructura siguiente (con el lado derecho acoplado al resto de fármaco):



En algunas realizaciones, al menos uno de R^4, $R^{4'}$, R^5 y $R^{5'}$ une dicho fármaco a L^1, si está presente, o a F, H, J, o X^2, y R^3 se selecciona de SR^{11}, NHR^{11} y OR^{11}. R^{11} se selecciona de $-SO(OH)_2$, $-PO(OH)_2$, $-AA_n$, $-Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$, $-C(O)OPhNH(AA)_m$,

 ,  ,  ,

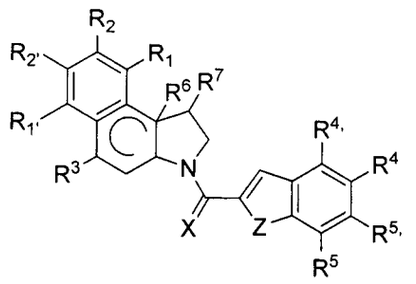
 ,  ,  ,

 ,  ,

, , , y ,

y sus sales farmacéuticamente aceptables, donde n es cualquier número entero comprendido en el intervalo de 1 a 10, m es cualquier número entero en el intervalo de 1 a 4, p es cualquier número entero en el intervalo de 1 a 6, y AA es cualquier aminoácido natural o no natural. En los casos en que el compuesto de fórmula (e) está conjugado por R^4, $R^{4'}$, R^5 o R^6, R^3 comprende preferiblemente un grupo escindible bloqueante cuya presencia bloquea la actividad citotóxica del compuesto, pero es escindible en las condiciones que se encuentran en el sitio de acción propuesto por un mecanismo diferente del correspondiente a la escisión del enlazador que conjuga la citotoxina al anticuerpo. De este modo, si existe una escisión accidental del conjugado en el plasma, el grupo bloqueante atenúa la citotoxicidad de la citotoxina liberada. Por ejemplo, si el conjugado tiene un enlazador hidrazona o disulfuro, el grupo bloqueante puede ser una amida escindible enzimáticamente. O bien, si el enlazador es un enlazador peptidilo escindible por una proteasa, el grupo bloqueante puede ser un éster o carbamato escindible por una carboxiesterasa.

Por ejemplo, en una realización preferida, D es una citotoxina que tiene una estructura (j):



(j)

En esta estructura, R^3, R^6, R^7, R^4, $R^{4'}$, R^5, $R^{5'}$, y X son como se describe arriba para la fórmula (e). Z es un miembro seleccionado de O, S y NR^{23}, donde R^{23} es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido, y acilo.

R^1 es H, alquilo inferior sustituido o insustituido, $C(O)R^8$, o CO_2R^8, en donde R^8 es un miembro seleccionado de NR^9R^{10} y OR^9, en los cuales R^9 y R^{10} son miembros seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o insustituido y heteroalquilo sustituido o insustituido.

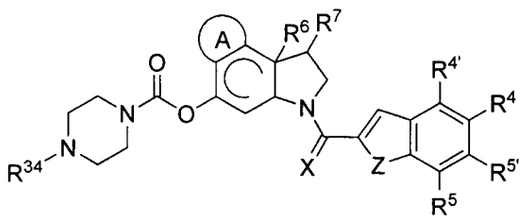
$R^{1'}$ es H, alquilo inferior sustituido o insustituido, o $C(O)R^8$, en donde R^8 es un miembro seleccionado de NR^9R^{10} y OR^9, en los cuales R^9 y R^{10} son miembros seleccionados independientemente de H, alquilo sustituido o insustituido y heteroalquilo sustituido o insustituido.

R^2 es H, o alquilo inferior sustituido o insustituido, o heteroalquilo insustituido, o ciano o alcoxi; y $R^{2'}$ es H, o

alquilo inferior sustituido o insustituido o heteroalquilo insustituido.

Uno de R^3, R^4, $R^{4'}$, R^5 o $R^{5'}$ enlaza la citotoxina a L^1 o L^3 si está presente, o a F, H, o J.

Una realización adicional tiene la fórmula:



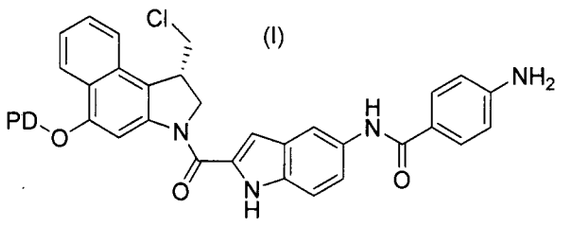
En esta estructura, A, R^6, R^7, X, R^4, $R^{4'}$, R^5 y $R^{5'}$ son como se describe arriba para la fórmula (e). Z es un miembro seleccionado de O, S y NR^{23}, donde R^{23} es un miembro seleccionado de H, alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido, y acilo;

R^{34} es $C(=O)R^{33}$ o alkyl C_1-C_6, donde R^{33} se selecciona de H, alquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, heteroarilo sustituido o insustituido, heterocicloalquilo sustituido o insustituido, halógeno, NO_2, $NR^{15}R^{16}$, $NC(O)R^{15}$, $OC(O)NR^{15}R^{16}$, $OC(O)OR^{15}$, $C(O)R^{15}$, SR^{15}, OR^{15}, $CR^{15}=NR^{16}$, y $O(CH_2)_nN(CH_3)_2$, donde n es un entero de 1 a 20. R^{15} y R^{16} representan independientemente H, alquilo sustituido o insustituido, heteroalquilo sustituido o insustituido, arilo sustituido o insustituido, heteroarilo sustituido o insustituido, heterocicloalquilo sustituido o

insustituido y peptidilo sustituido o insustituido, donde R^{15} y R^{16}, junto con el átomo de nitrógeno al cual están unidos, se unen opcionalmente para formar un sistema de anillo heterocicloalquilo sustituido o insustituido que tiene 4 a 6 miembros, que contienen opcionalmente dos o más heteroátomos.

Preferiblemente, A es fenilo sustituido o insustituido o pirrol sustituido o insustituido. Adicionalmente, cualquier selección de sustituyentes descrita en esta memoria para R^{11} es aplicable también a R^{33}.

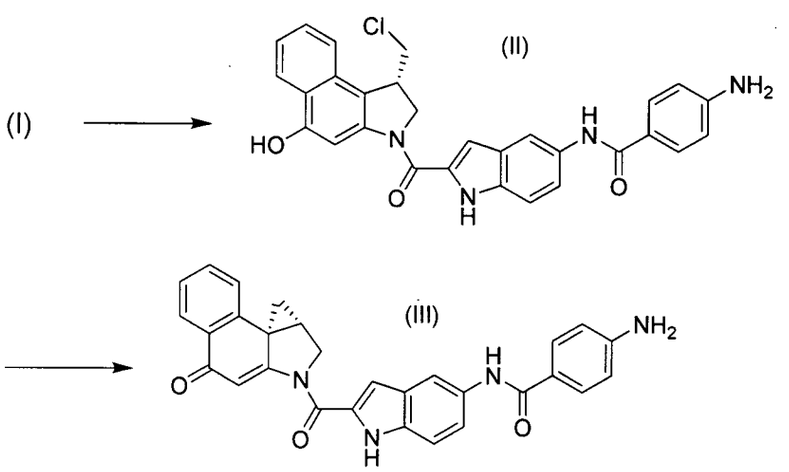
Una molécula asociada preferida tiene una estructura representada por la fórmula (I)



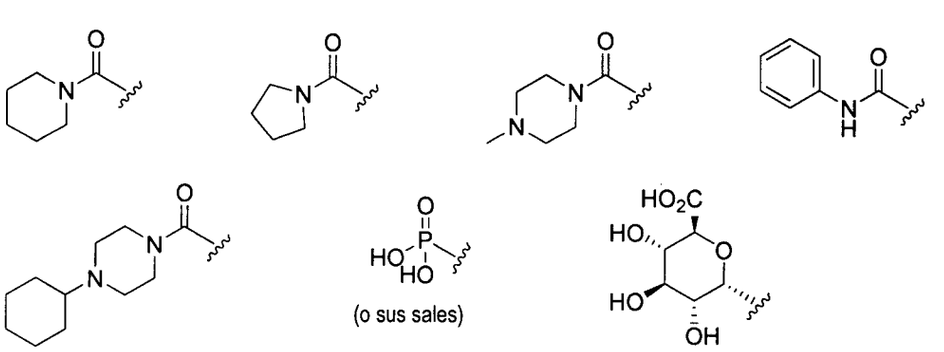
(I)

En la fórmula (I), PD representa un grupo formador de profármaco (al que se hace referencia también a veces como un grupo protector). El compuesto (I) se hidroliza in situ (preferiblemente por vía enzimática) para liberar el compuesto de fórmula (II). Como reconocerán los expertos en la técnica, el compuesto (II) pertenece a la clase de compuestos conocidos como compuestos CBI (Boger *et al.*, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6654-6661 y Boger *et al.*, Patente de los Estados Unidos 2005/0014700 A1 (2005). Los compuestos

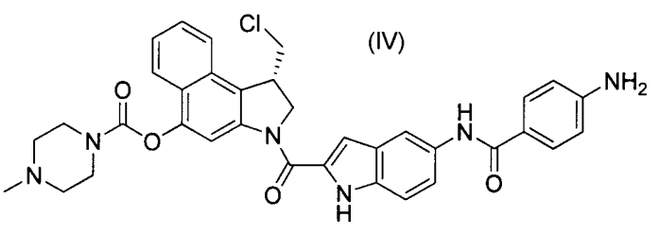
CBI se convierten in situ (o, cuando se administran a un paciente, in vivo) en sus derivados de ciclopropilo tales como el compuesto (III), se fijan a la hendidura menor del DNA, y alquilan luego el DNA en un grupo adenina, creyéndose que el derivado de ciclopropilo es la especie alquilante real.



Ejemplos no limitantes de grupos PD que actúan como profármaco incluyen ésteres, carbamatos, fosfatos, y glicósidos, como se ilustra a continuación:



Grupos PD preferidos que actúan como profármacos son carbamatos (ilustrados por las 5 primeras estructuras anteriores), que son hidrolizables por carboxiesterasas; fosfatos (la sexta estructura anterior), que son hidrolizables por fosfatasa alcalina, y derivados de ácido β-glucurónico, que son hidrolizables por β-glucuronidasa. Una molécula asociada específica preferida es una de carbamato que actúa como profármaco, representada por la fórmula (IV):



Identificadores como Moléculas Asociadas

En el caso en que la molécula asociada es un identificador, el mismo puede ser cualquier resto que tenga o genere una propiedad física o química detectable, indicando con ello su presencia en un tejido o célula particular. Los identificadores (denominados también a veces grupos informadores) han sido muy desarrollados en el área de los inmunoensayos, la investigación biomédica y el diagnóstico médico. Un identificador puede ser detectado por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Ejemplos incluyen cuentas magnéticas (v.g., DYNABEADS™), colorantes fluorescentes (*v.g.*, isotiocianato de fluoresceína, rojo

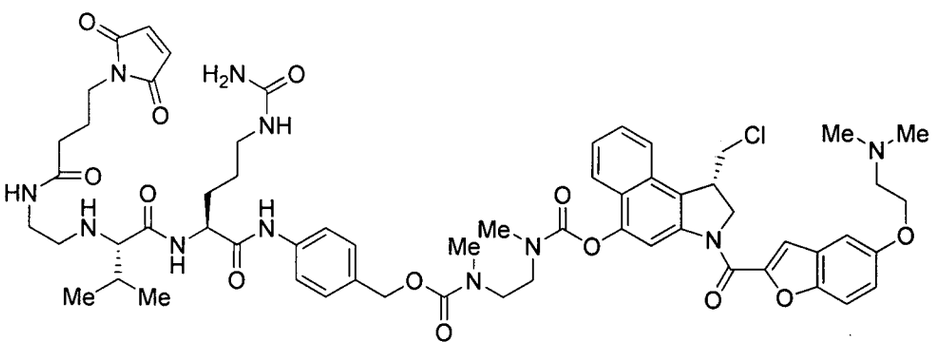
Texas, rodamina, y análogos), radiomarcadores (*v.g.*, ^{3}H, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, o ^{32}P), enzimas (*v.g.*, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras utilizadas comúnmente en un ELISA), y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o cuentas coloreadas de vidrio o plástico (*v.g.*, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

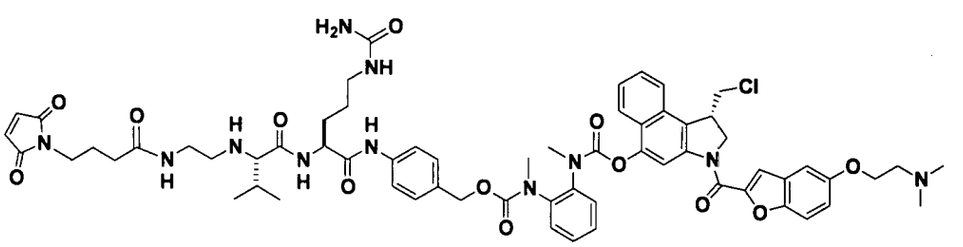
El indicador es preferiblemente un miembro seleccionado del grupo constituido por isótopos radiactivos, agentes fluorescentes, precursores de agentes fluorescentes, cromóforos, enzimas y combinaciones de los mismos. Ejemplos de enzimas adecuadas son peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, y glucosa-oxidasa. Agentes fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, umbelifenona, *etc.* Compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina, y 2,3-dihidroftalazinadionas, *v.g.*, luminol. Para una revisión de diversos sistemas marcadores o productores de señales que pueden utilizarse, véase el documento de los Estados Unidos 4.391.904.

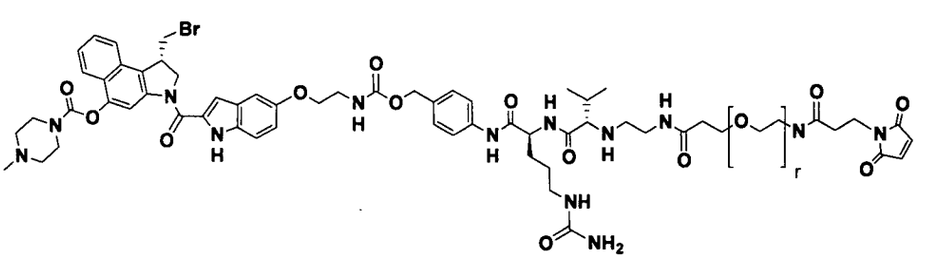
Los marcadores pueden estar unidos por medios indirectos: una molécula ligando (*v.g.*, biotina) se une covalentemente a un anticuerpo. El ligando se une luego a otra molécula (*v.g.*, estreptavidina), que es o bien inherentemente detectable o se une covalentemente a un sistema de señalización, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente, o un compuesto quimioluminiscente.

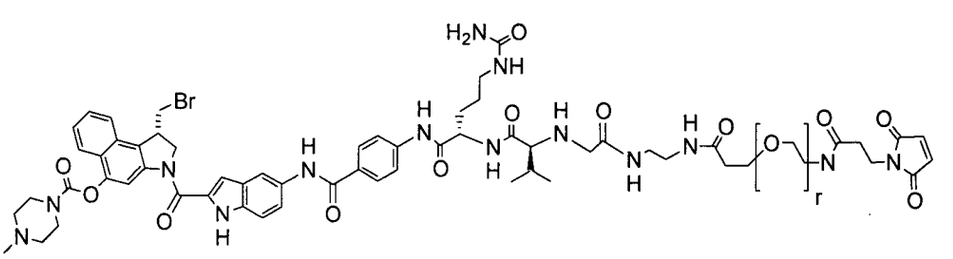
Ejemplos de Conjugados

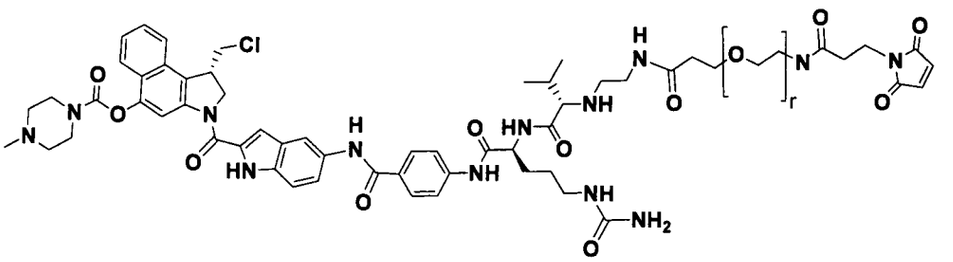
Ejemplos específicos de combinaciones molécula asociada-enlazador adecuadas para conjugación a un anticuerpo de esta invención se muestran a continuación:



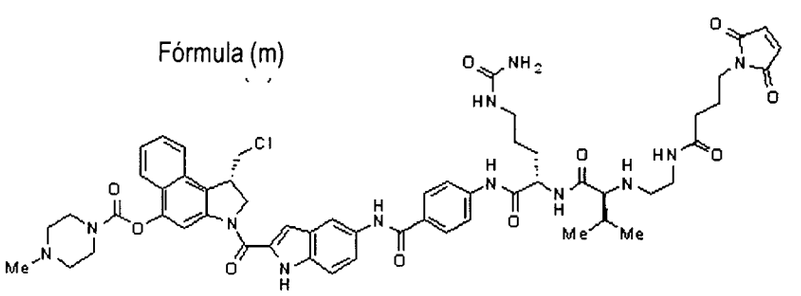




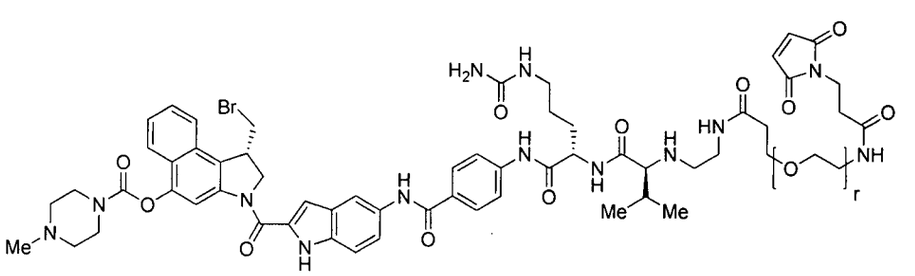


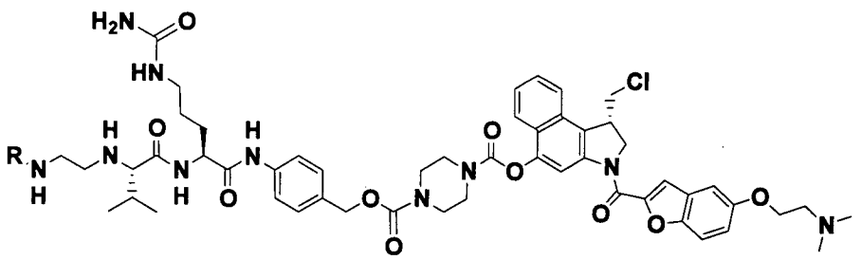


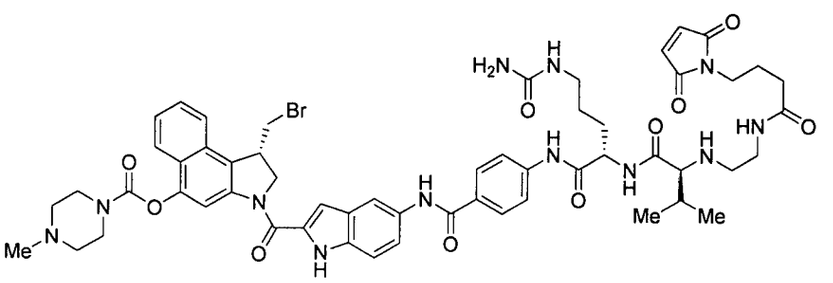
Fórmula (m)

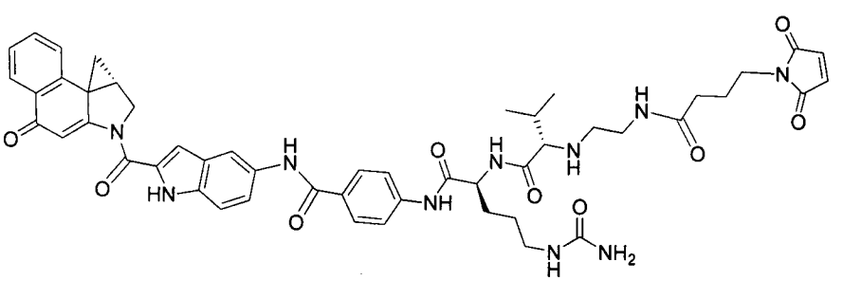


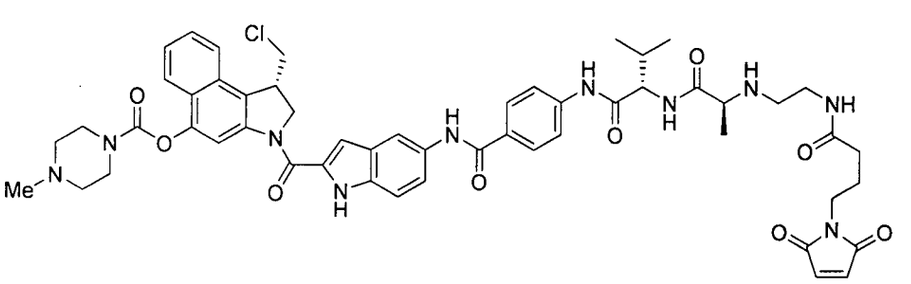
Toxina B

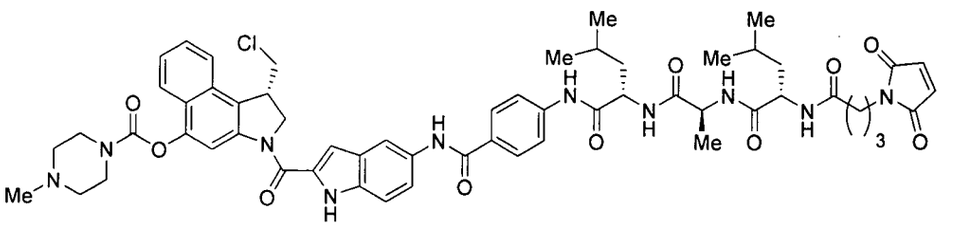


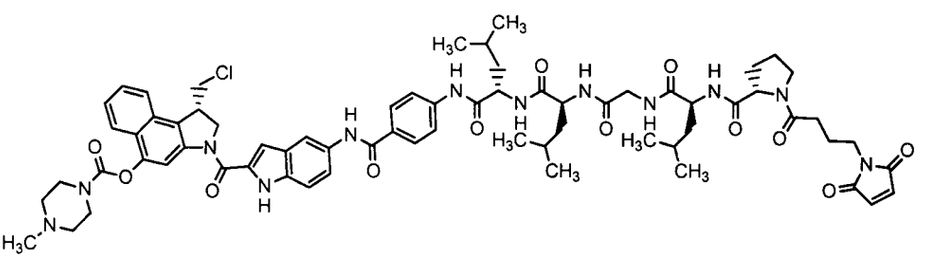


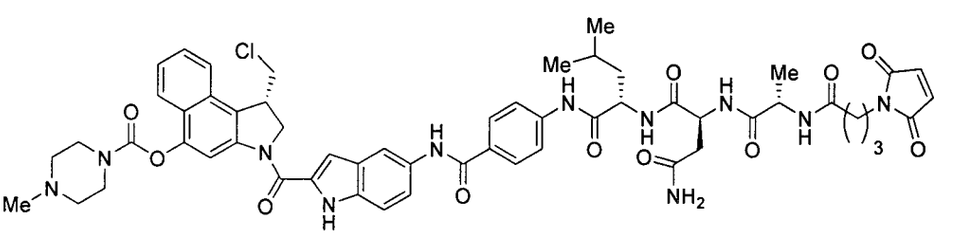


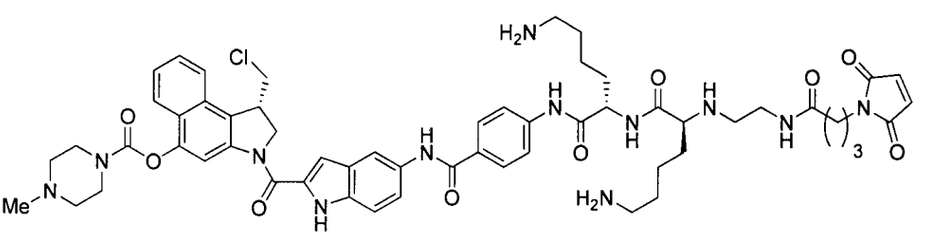


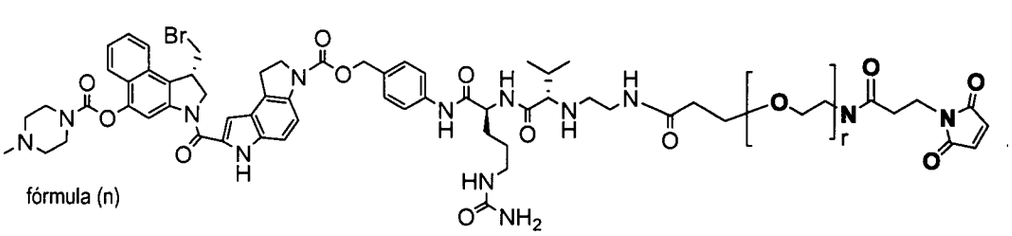




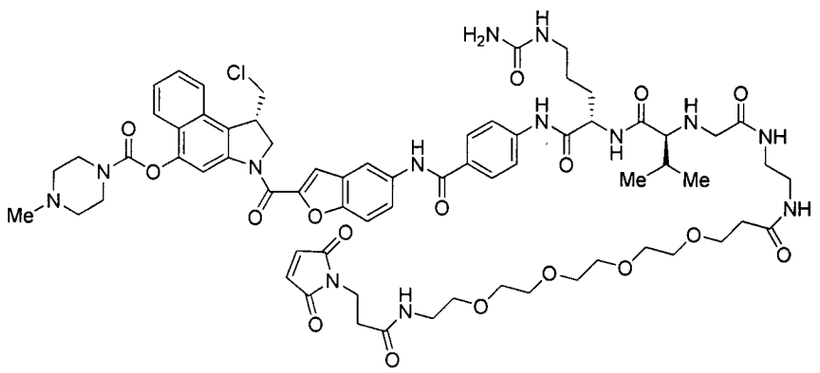


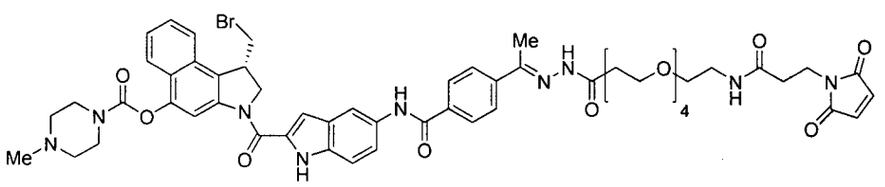


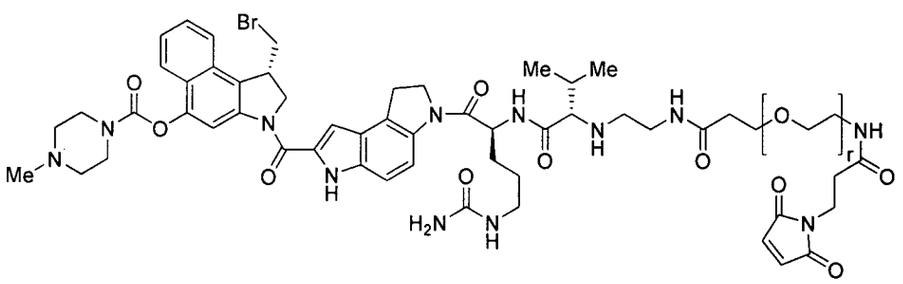


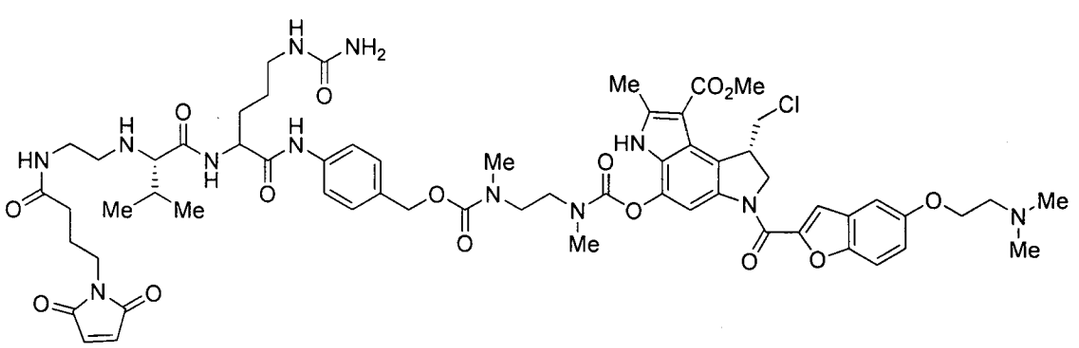


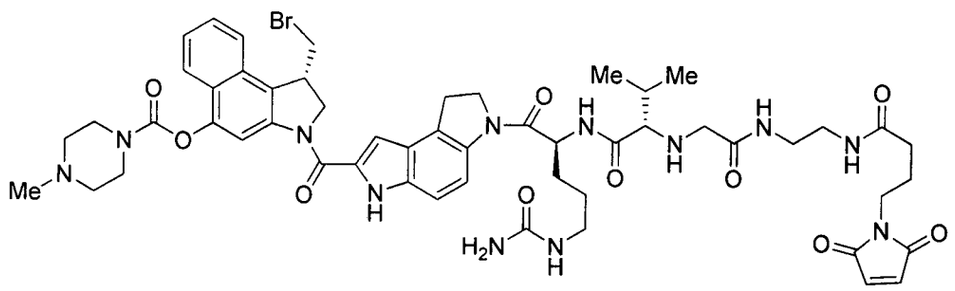
fórmula (n)

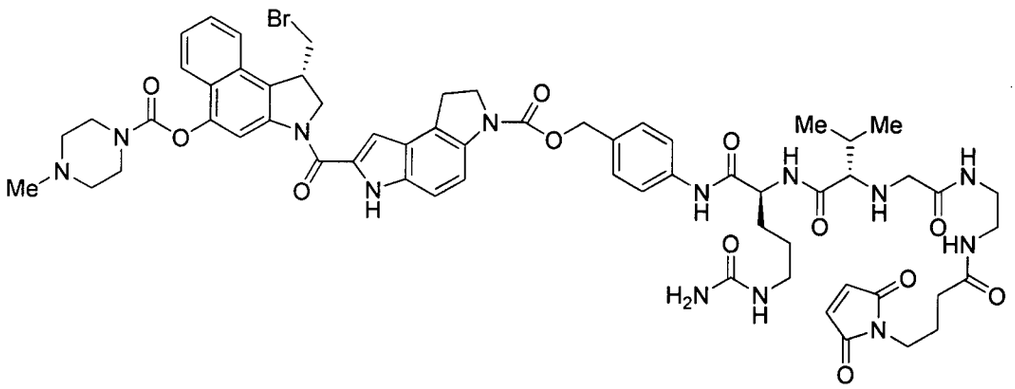


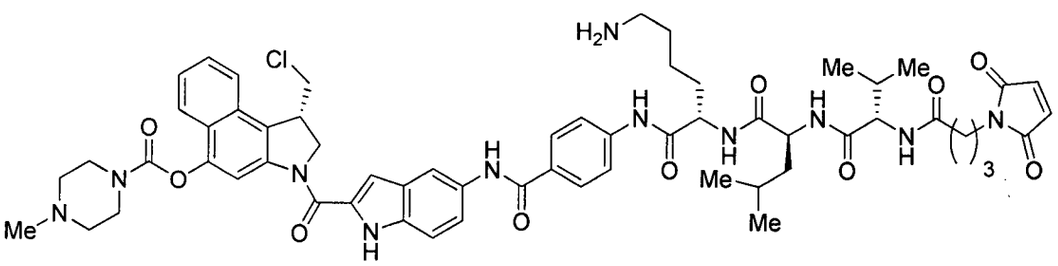


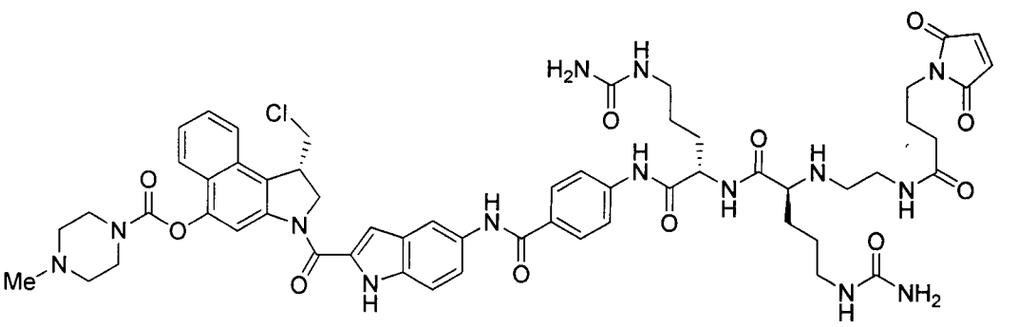


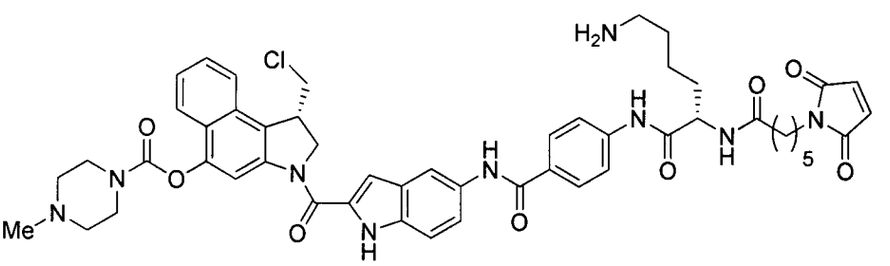


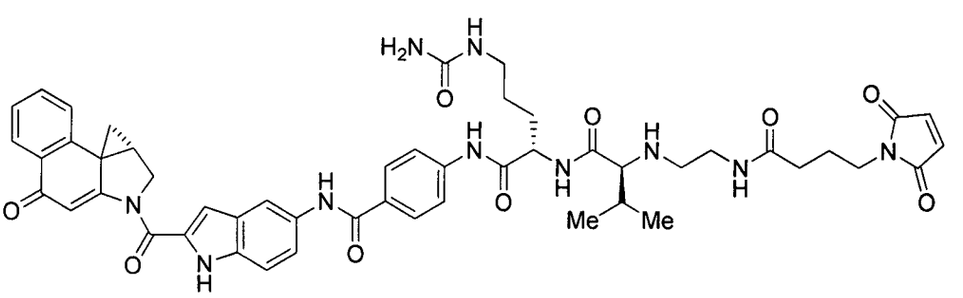


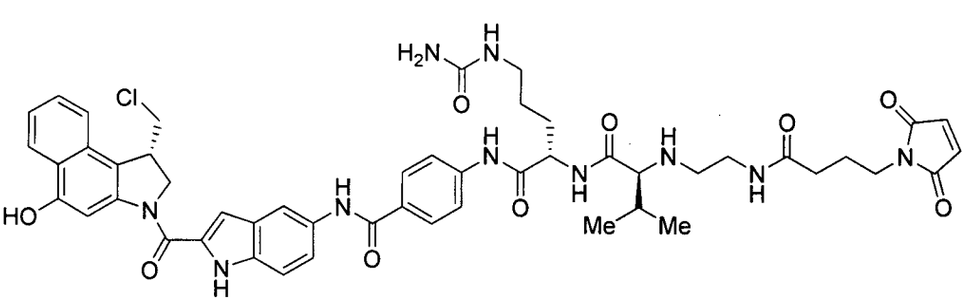


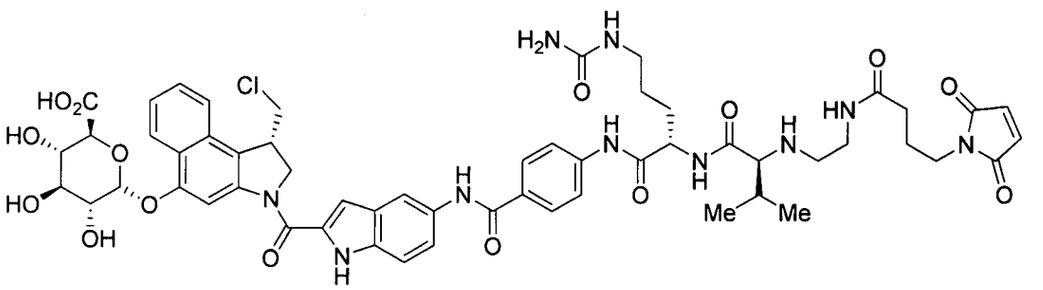




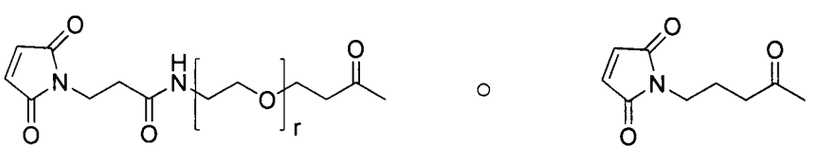








En los compuestos anteriores, donde el subíndice r está presente en una fórmula, el mismo es un número entero comprendido en el intervalo de 0 a 24, preferiblemente 4. R, en los casos en que existe, es



Cada uno de los compuestos anteriores tiene un grupo maleimida y está listo para conjugación a un anticuerpo por la vía de un grupo sulfhidrilo en el mismo.

Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la presente descripción proporciona una composición, *v.g.*, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o una o más porciones de fijación de antígeno de los mismos, de la presente descripción, formulada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de anticuerpos (*v.g.*, dos o más diferentes), o inmunoconjugados o moléculas

biespecíficas de esta descripción. Por ejemplo, una composición farmacéutica de esta descripción puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas) que se unen a diferentes epítopes en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de esta descripción pueden administrarse también en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-B7-H4 de la presente descripción combinado con al menos otro agente anticáncer. Ejemplos de agentes terapéuticos que pueden utilizarse en terapia de combinación se describen con mayor detalle más adelante en la sección de usos de los anticuerpos de esta descripción.

Como se utiliza en esta memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y la totalidad de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y análogos, que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, raquídea o epidérmica (*v.g.*, por inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo (es decir el anticuerpo, inmunoconjugado, o molécula biespecífica, puede estar recubierto con un

material para proteger el compuesto contra la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que pueden desactivar el compuesto.

Los compuestos farmacéuticos de esta descripción pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Una "sal farmacéuticamente aceptable" hace referencia a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto originario y no imparte efecto toxicológico indeseable alguno (véase v.g., Berge, S.M., *et al.*, (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como los ácidos clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y análogos, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanoicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxi-alcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y análogos. Sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y análogos (sic), así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína y análogas.

Una composición farmacéutica de esta descripción puede incluir también un antioxidante farmacéuticamente

aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloruro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y análogos; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y análogos; y (3) agentes formadores de quelatos con metales, tales como ácido cítrico, ácido etilenodiamina-tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico (sic), y análogos.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de estas descripción incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y análogos), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y por el uso de agentes tensioactivos.

Estas composiciones pueden contener también adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse por

procedimientos de esterilización, *supra*, y por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabén, clorobutanol, ácido fenol-sórbico, y análogos. Puede ser también deseable incluir en las composiciones agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y análogos. Adicionalmente, puede provocarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable por la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones farmacéuticas de esta descripción. Compuestos activos suplementarios pueden incorporarse también en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas deben ser típicamente estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo,

glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y análogos), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de agentes tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede favorecerse por inclusión en la composición de un agente que retarda la absorción, por ejemplo, sales monoestearato y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles por incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes arriba enumerados, en caso requerido, seguido por microfiltración-esterilización. Generalmente, las dispersiones se preparan por incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio básico de dispersión y los otros ingredientes requeridos de los arriba enumerados. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, los métodos preferidos de preparación son secado a vacío y secado por congelación (liofilización) que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución previamente filtrada en condiciones estériles del mismo.

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma de dosificación simple variará dependiendo del sujeto a tratar, y del modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma de dosificación simple será generalmente aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de cada 100 por ciento, esta cantidad estará comprendida entre aproximadamente 0,01 por ciento y aproximadamente 99 por ciento de ingrediente activo, con preferencia desde aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, y de modo muy preferible desde aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (es decir, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un bolus simple, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según venga aconsejado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidades de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación, tal como se utiliza en esta memoria, hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para

los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de esta descripción viene dictada por y es directamente dependiente de (a) las características singulares del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de preparación de composiciones de dicho ingrediente activo para el tratamiento de la sensibilidad en los sujetos.

Para administración del anticuerpo, la dosificación varía desde aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg, y más usualmente 0,01 a 5 mg/kg, del peso corporal del hospedador. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser de 0,3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal, o dentro del intervalo de 1-10 mg/kg. Un régimen de tratamiento ilustrativo implica la administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, una vez al mes, una vez cada 3 meses, o una vez cada 3 a 6 meses. Regímenes de dosificación preferidos para un anticuerpo anti-B7-H4 de esta descripción incluyen 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal por administración intravenosa, administrándose el anticuerpo con utilización de uno de los protocolos de dosificación siguientes: (i) cada 4 semanas durante 6 dosificaciones, y luego cada 3 meses; (ii) cada 3

semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una sola vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada 3 semanas.

En algunos métodos, se administran simultáneamente dos o más anticuerpos monoclonales con especificidades de fijación diferentes, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está comprendida dentro de los intervalos indicados. El anticuerpo se administra usualmente en ocasiones múltiples. Los intervalos entre las dosificaciones simples pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada 3 meses, o anualmente. Los intervalos pueden ser también irregulares según venga indicado por la medida de los niveles en sangre de anticuerpo para el antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación se ajusta para alcanzar una concentración de anticuerpo en plasma de aproximadamente 1-1000 µg/ml, y en algunos métodos aproximadamente 25-300 µg/ml.

Como alternativa, el anticuerpo puede administrarse como una formulación de liberación prolongada, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosificación y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del anticuerpo en el paciente. En general, los anticuerpos humanos exhiben la semivida más larga, seguidos por anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En las

aplicaciones profilácticas, se administra una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un periodo de tiempo prolongado. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, se requiere a veces una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que se reduce o termina el progreso de la enfermedad, y preferiblemente hasta que el paciente acusa una mejora parcial o completa de los síntomas de la enfermedad. Después de ello, puede administrarse al paciente un régimen profiláctico.

Para uso en la profilaxis y/o el tratamiento de enfermedades relacionadas con la proliferación celular anormal, se prefiere una concentración circulante del compuesto administrado de aproximadamente 0,001 µM a 20 µM, prefiriéndose aproximadamente 0,01 µM a 5 µM.

Las dosis administradas a los pacientes en el caso de la administración oral de los compuestos descritos en esta memoria están comprendidas por regla general entre aproximadamente 1 mg/día y aproximadamente 10.000 mg/día, de modo más general entre aproximadamente 10 mg/día y aproximadamente 1000 mg/día, y de modo más general entre aproximadamente 50 mg/día y aproximadamente 500 mg/día. Expuestas en términos de peso corporal del paciente, las dosis típicas varían desde aproximadamente 0,01 a aproximadamente 150 mg/kg/día, de modo más general desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 15 mg/kg/día, y de

modo más general desde aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg/día, por ejemplo 5 mg/kg/día por 3 mg/kg/día.

En al menos algunas realizaciones, las dosis administradas a los pacientes que retardan o inhiben el crecimiento de los tumores pueden ser 1 µmol/kg/día o menos. Por ejemplo, las dosis administradas a los pacientes pueden ser 0,9, 0,6, 0,5, 0,45, 0,3, 0,2, 0,15, ó 0,1 µmol/kg/día o menos (referidas a moles del fármaco). Preferiblemente, el conjugado anticuerpo-fármaco retarda el crecimiento del tumor cuando se administra en la cantidad de dosificación diaria durante un periodo de al menos 5 días. En al menos algunas realizaciones, el tumor es un tumor de tipo humano en un ratón SCID. Como ejemplo, el ratón SCID puede ser un ratón CB17.SCID (disponible de Taconic, Germantown, NY).

Los niveles reales de dosificación de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden modificarse a fin de obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para alcanzar la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo de administración particulares, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente descripción empleadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la ruta de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplee, la

duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, el estado general de salud y la historia médica anterior del paciente que se esté tratando, y factores análogos bien conocidos en las técnicas médicas.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo anti-B7-H4 de esta descripción da preferiblemente como resultado una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en la frecuencia y duración de los periodos exentos de síntomas de la enfermedad, o una prevención del deterioro o la incapacidad debidos a la aflicción causada por la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de sujetos que sufren tumores, una "dosificación terapéuticamente eficaz" inhibe preferiblemente el crecimiento del tumor al menos aproximadamente en un 20%, de modo más preferible al menos aproximadamente en un 40%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente en un 60%, y todavía más preferiblemente al menos aproximadamente en un 80% con relación a los sujetos sin tratar. La capacidad de un compuesto para inhibir el crecimiento tumoral puede evaluarse en un sistema modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse por examen de la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular, pudiendo medirse dicha inhibición *in vitro* por ensayos conocidos por el profesional experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz

de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño del tumor, o mejorar de cualquier otro modo los síntomas en un sujeto. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica podría determinar dichas cantidades basándose en factores tales como la corpulencia del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto, y la composición particular o ruta de administración seleccionada.

Una composición de la presente descripción puede administrarse por una o más rutas de administración utilizando uno o más de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como será apreciado por el profesional experto, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Rutas de administración preferidas para los anticuerpos de esta descripción incluyen las rutas intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, raquídea u otras rutas de administración parenteral, por ejemplo por inyección o infusión. La expresión "administración parenteral", tal como se utiliza en esta memoria, significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea, epidural e intraesternal.

Como alternativa, un anticuerpo de esta descripción puede administrarse por una ruta no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidérmica o mucosal, por ejemplo intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tales como una fórmula de liberación controlada, con inclusión de implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos generalmente por los expertos en la técnica. Véanse *v.g., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, compilador, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de esta descripción puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, como los dispositivos descritos en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5399163; 5383851; 5312335, 5064413, 4941880; 4790824; o 4596556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente descripción incluyen: Patente de los Estados Unidos No. 4487603, que describe una bomba de

micro-infusión implantable para dispensar medicación a una tasa controlada; la Patente de los Estados Unidos No. 4486194, que describe un dispositivo terapéutico para administración de medicamentos a través de la piel; la Patente de los Estados Unidos No. 4447233, que describe una bomba de infusión de medicación para suministro de medicación a una tasa de infusión precisa; la Patente de los Estados Unidos No. 4447224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para suministro continuo de fármaco; la Patente de los Estados Unidos No. 4439196, que describe un sistema de suministro osmótico de fármacos que tiene compartimientos de cámaras múltiples; y la Patente de los Estados Unidos No. 4475196, que describe un sistema de suministro osmótico de fármacos. Estas patentes se incorporan en la presente memoria por referencia. Muchos otros implantes, sistemas de suministro, y módulos de este tipo son conocidos por los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos de esta descripción pueden formularse para asegurar una distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurarse de que los compuestos terapéuticos de esta descripción atraviesan la BBB (en caso deseado), pueden formularse los mismos, por ejemplo, en liposomas. Con respecto a métodos de fabricación de liposomas, véanse, v.g., las Patentes de los Estados Unidos 4522811; 5374548; y 5399331. Los liposomas pueden

comprender uno o más restos que son transportados selectivamente a células u órganos específicos, mejorando así el suministro direccionado del fármaco (véase, v.g., V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Restos de direccionamiento ilustrativos incluyen folato o biotina (véanse, *v.g.*, Patente de los Estados Unidos 5416016 otorgada a Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor tensioactivo de Proteína A (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Usos y Métodos de esta Descripción

Los conjugados anticuerpo-molécula asociada que comprenden anticuerpos, particularmente los anticuerpos humanos, composiciones de anticuerpos y métodos de la presente descripción tienen numerosas utilidades diagnósticas y terapéuticas *in vitro* e *in vivo* que implican, por ejemplo, detección de B7-H4, tratamiento del cáncer o mejora de la respuesta inmunitaria por bloqueo de B7-H4. En una realización preferida, los anticuerpos de la presente descripción son anticuerpos humanos. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, in vitro o ex vivo o a sujetos humanos, v.g., in vivo, para tratar, prevenir y diagnosticar una diversidad de

trastornos o mejorar la inmunidad en una diversidad de situaciones.

Como se utiliza en esta memoria, el término "sujeto" tiene por objeto incluir animales humanos y no humanos. El término "animales no humanos" incluye todos los vertebrados, v.g., mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios y reptiles. Sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que padecen trastornos asociados con la expresión de B7-H4 o que se encuentran en necesidad de mejora de una respuesta inmunitaria. Los métodos son particularmente adecuados para el tratamiento de pacientes humanos que tengan un trastorno asociado con la expresión aberrante de B7-H4. Los métodos son también particularmente adecuados para el tratamiento de pacientes humanos que sufran un trastorno que puede ser tratado por aumento de la respuesta inmunitaria mediada por las células T. Para conseguir el aumento de inmunidad específico de antígeno, los anticuerpos anti-B7-H4 pueden administrarse junto con un antígeno de interés. Cuando los anticuerpos para B7-H4 se administren junto con otro agente, pueden administrarse ambos en cualquier orden o simultáneamente.

Dada la fijación específica de los anticuerpos de esta descripción para B7-H4, los anticuerpos de esta descripción pueden utilizarse para detectar específicamente la expresión de B7-H4 en la superficie de las células y,

además, pueden utilizarse para purificar B7-H4 por la vía de purificación por inmunoafinidad.

B7-H4 se expresa en una diversidad de cánceres humanos, con inclusión de carcinomas de células mamarias, cánceres metastásicos de mama, carcinomas de células ováricas, cánceres metastásicos de ovario y carcinomas de células renales (Tringler et al (2005) *Clinical Cancer Res. U*: 1842-48; Salceda *et al.* (2005) Exp Cell Res. 306:128-41; Tringler *et al.* (2006) *Gynecol Oncol.* 100:44-52; Krambeck *et al.* (2006) *Proc Natl Acad Sci USA* 103:10391-6; Chen *et al.* (2006) *Kidney Int. Epub;* Sun *et al.* (2006) *Lung Cancer* 53:143-51; Bignotti *et al.* (2006) *Gynecol Oncol.* 103:405-16; Kryczek *et al.* (2006) *J Exp Med* 203:871-81; Simon *et al.* (2006) *Cancer Res.* 66:1570-5). Un anticuerpo anti-B7-H4 puede utilizarse solo para inhibir el crecimiento de tumores cancerosos. Como alternativa, un anticuerpo anti-B7-H4 puede utilizarse en asociación con otros agentes inmunógenos, tratamientos estándar del cáncer u otros anticuerpos, como se describe más adelante.

Se ha demostrado que el atenuador de los linfocitos B y T (BTLA) es el receptor para B7-H4 y tiene un efecto inhibidor sobre las respuestas inmunitarias, similar al antígeno-4 de los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y la muerte programada-1 (PD-1) (Carreno y Collins (2003) *Trends Immunol* 24:524-7). B7-H4 funciona por regulación negativa de la inmunidad de las células T por la inhibición de la proliferación de las células T, producción de citoquinas y

producción del ciclo celular (Choi *et al.* (2003) *J. Immunol.* 171:4650-4). Una proteína de fusión B7-H4-Ig inhibe la activación de las células T, mientras que el bloqueo de B7-H4 por anticuerpos puede aumentar la respuesta inmunitaria en el paciente (Sica *et al.* (2003) *Immunity* 18:849-61).

En un aspecto, la presente descripción hace referencia al tratamiento de un sujeto in vivo utilizando un anticuerpo anti-B7-H4 de tal modo que se inhibe el crecimiento de los tumores cancerosos. Un anticuerpo anti-B7-H4 puede utilizarse solo para inhibir el crecimiento de tumores cancerosos. Como alternativa, un anticuerpo anti-B7-H4 puede utilizarse en asociación con otros agentes inmunógenos, tratamientos estándar del cáncer u otros anticuerpos, como se describe más adelante.

De acuerdo con ello, en una realización, esta descripción proporciona un método para inhibir el crecimiento de las células tumorales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4 o porción de fijación de antígeno del mismo. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano anti-B7-H4 (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos anti-B7-H4 humana descritos en esta memoria). Adicionalmente o como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-B7-H4 quimérico o humanizado.

Cánceres preferidos cuyo crecimiento puede ser inhibido utilizando los anticuerpos de esta descripción incluyen cánceres típicamente sensibles a la inmunoterapia. Ejemplos no limitantes de cánceres preferidos para el tratamiento incluyen cáncer de mama (v.g., carcinoma de células mamarias), cáncer de ovario (v.g., carcinoma de células ováricas) y carcinoma de células renales (RCC). Ejemplos de otros cánceres que pueden ser tratados utilizando los métodos de esta descripción incluyen melanoma (v.g., melanoma metastásico maligno), cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, tumores cerebrales, leucemias crónicas o agudas con inclusión de leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfomas (v.g., linfoma de Hodgkin y linfoma no-Hodgkin, linfoma linfocítico, linfoma primario del CNS, linfoma de células T), carcinomas nasofaríngeos, cáncer de cabeza o cuello, mieloma cutáneo o intraocular maligno, cáncer uterino, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer uterino, carcinoma de los tubos de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula mamaria, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, tumores sólidos de la infancia, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de la pelvis o

mamario, neoplasma del sistema nervioso central (CNS), angiogénesis tumoral, tumor del eje raquídeo, glioma del tallo cerebral, adenoma hipofisario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, cánceres inducidos por el medio ambiente con inclusión de los inducidos por asbesto, v.g., mesotelioma y combinaciones de dichos cánceres.

Opcionalmente, los anticuerpos para B7-H4 pueden combinarse con un agente inmunógeno, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (con inclusión de proteínas recombinantes, péptidos y moléculas de carbohidrato), células y células transfectadas con genes codificantes de citoquinas inmunoestimulantes (He et al, *J. Immunol.* 173:4919-28 (2004)). Ejemplos no limitantes de vacunas tumorales que pueden utilizarse incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa o células tumorales transfectadas para expresar la citoquina GM-CSF. En los humanos, se ha demostrado que algunos tumores son inmunógenos, tales como melanomas. Se anticipa que por aumento del umbral de activación de las células T por bloqueo de B7-H4, los tumores pueden activarse en respuestas en el hospedador.

El bloqueo de B7-H4 alcanza probablemente su máxima eficacia cuando se combina con un protocolo de vacunación. Han sido ideadas muchas estrategias experimentales para vacunación contra tumores (véase, Rosenberg "Development of

Cancer Vaccines" ASCO Educational Book Spring: 60-62 (2000); Logothetis, ASCO Educational Book Spring: 300-302 (2000); Khayat, ASCO Educational Book Spring: 414-428 (2000); Foon, ASCO Educational Book Spring: 730-738 (2000); véase también Restifo y Sznol, Cancer Vaccines, Cap. 61, págs. 3023-3043 en De Vita *et al.* (compiladores) Cancer: Principles and Practice of Oncology, quinta edición (1997)). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna utilizando células tumorales autólogas o alogénicas. Típicamente, estas vacunas celulares alcanzan su máxima eficacia cuando las células tumorales se someten a transducción para expresar GM-CSF. Se ha demostrado que GM-CSF es un activador potente de la presentación de antígeno para vacunación tumoral (Dranoff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:3539-43 (1993)).

El estudio de la expresión génica y de los patrones de expresión génica en gran escala en diversos tumores ha conducido a la definición de los denominados antígenos específicos de tumores (Rosenberg, *Immunity* 10:281-7 (1999)). En muchos casos, estos antígenos específicos de tumores son antígenos de diferenciación expresados en los tumores y en la célula de la que surgió el tumor, por ejemplo antígenos de melanocitos gp100, antígenos MAGE y Trp-2. Y lo que es más importante, puede demostrarse que muchos de estos antígenos que son las dianas de células T específicas de tumores encontradas en el hospedador. El bloqueo de B7-H4 puede utilizarse en asociación con un conjunto de proteínas y/o péptidos recombinantes expresados

en un tumor a fin de generar una respuesta inmunitaria a estas proteínas. Estas proteínas son consideradas normalmente por el sistema inmunitario como autoantígenos y son por tanto tolerantes para ellos. El antígeno tumoral puede incluir también la proteína telomerasa, que se requiere para la síntesis de telómeros de cromosomas y que se expresa en más del 85% de los cánceres humanos y solamente en un número limitado de tejidos somáticos (Kim *et al.*, *Science* 266:2011-2013 (1994)). (Estos tejidos somáticos pueden estar protegidos contra el ataque inmunitario por diversos medios). Antígenos tumorales pueden ser también "neo-antígenos" expresados en células de cáncer debido a mutaciones somáticas que alteran la secuencia de las proteínas o crean proteínas de fusión entre dos secuencias no afines (por ejemplo bcr-abl en el cromosoma Philadelphia) o idiotipo de tumores de células B.

Otras vacunas de tumores pueden incluir las proteínas de virus implicados en cánceres humanos tales como los Virus del Papiloma Humano (HPV), Virus de la Hepatitis (HBV y HCV) y Virus del Sarcoma del Herpes de Kaposi (KHSV). Otra forma de antígeno tumoral específico que puede utilizarse en conjunción con el bloqueo de B7-H4 es la de las proteínas del choque térmico purificadas (HSP) aisladas del propio tejido del tumor. Estas proteínas del choque térmico contienen fragmentos de proteínas de las células tumorales, y estas HSPs son muy eficientes en el suministro a las células presentadoras de antígeno para suscitar la

inmunidad al tumor (Suot y Srivastava *Science* 269:1585-1588 (1995)); Tamura *et al. Science* 278:117-120 (1997)).

Las células dendríticas (DC) son células potentes presentadoras de antígeno que pueden utilizarse para cebar respuestas específicas de antígeno. Las DCs pueden producirse ex vivo y cargarse con diversos antígenos proteínicos y peptídicos así como extractos de células tumorales (Nestle, F. *et al.* (1998) *Nature Medicine* 4:328-232). Las DCs pueden transducirse también por medios genéticos para expresar asimismo estos antígenos tumorales. Las DCs se han fusionado también directamente a células tumorales para los propósitos de inmunización (Kugler, A. et al (2000) *Nature Medicine* 6:332-336). Como método de vacunación, la inmunización con DC puede combinarse eficazmente con el bloqueo de PD-1 para activar respuestas antitumorales más potentes.

El bloqueo de B7-H4 puede combinarse también con tratamientos estándar del cáncer. El bloqueo de B7-H4 puede combinarse eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. En estos casos, puede ser posible reducir la dosis de agente quimioterapéutico administrada (Mokyr, M. et al (1998) *Cancer Research* 58:5301-5304). Un ejemplo de combinación de este tipo es un anticuerpo anti-B7-H4 en combinación con descarbazina para el tratamiento de diversos cánceres. Otro ejemplo de una combinación de este tipo es un anticuerpo anti-B7-H4 en combinación con interleuquina-2 (IL-2) para el tratamiento de diversos cánceres. La base científica

racional que subyace en el uso combinado del bloqueo de B7-H4 y la quimioterapia es que la muerte celular, que es consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería dar como resultado niveles incrementados de antígeno tumoral en el camino de presentación del antígeno. Otras terapias de combinación que pueden dar como resultado sinergia con el bloqueo de B7-H4 por muerte celular son radiación, cirugía y privación hormonal. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el hospedador. Los inhibidores de angiogénesis pueden combinarse también con el bloqueo de B7-H4. La inhibición de la angiogénesis conduce a la muerte de las células tumorales que pueden alimentar el antígeno del tumor en los caminos de presentación de antígeno del hospedador.

Los anticuerpos bloqueantes de B7-H4 pueden utilizarse también en combinación con anticuerpos biespecíficos que dirigen las células efectoras que expresan el receptor Fc alfa o Fc gamma a las células del tumor (véanse, v.g. las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5922845 y 5837243). Pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para direccionar dos antígenos separados. Por ejemplo, se han utilizado anticuerpos biespecíficos anti-receptor Fc/antiantígeno tumoral (v.g., Her-2/neu) para direccionar macrófagos a sitios de tumor. Este direccionamiento puede activar más eficazmente las respuestas específicas del tumor. La rama de células T de estas respuestas podría incrementarse por el uso del bloqueo de B7-H4. Como

alternativa, el antígeno puede suministrarse directamente a DCs por el uso de anticuerpos biespecíficos que se fijan al antígeno tumoral y un marcador de la superficie de las células específico de células dendríticas.

Los tumores eluden la vigilancia inmunitaria del hospedador por una gran diversidad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden ser contrarrestados por la desactivación de proteínas que son expresadas por los tumores y que son imunosupresoras. Éstas incluyen entre otras TGF-beta (Kehrl, J. et al (1986) *J. Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) y el ligando Fas (Hahne, M. et al (1996) *Science* 274: 1363-1365). Pueden utilizarse anticuerpos para cada una de estas entidades en combinación con anti-PD-1 para contrarrestar los efectos del agente inmunosupresor y favorecer las respuestas inmunitarias a los tumores por el hospedador.

Otros anticuerpos que pueden ser utilizados para activar la sensibilidad inmune del hospedador pueden utilizarse en combinación con anti-B7-H4. Éstos incluyen moléculas en la superficie de las células dendríticas que activan la función de DC y la presentación de antígeno. Anticuerpos anti-CD40 son capaces de sustituir eficazmente la actividad adyuvante de las células T (Ridge, J. *et al.* (1998) *Nature* 393:474-478) y pueden utilizarse en asociación con anticuerpos B7-H4. Anticuerpos activadores para las moléculas coestimulantes de las células T tales como CTLA-4

(v.g., la Patente US Núm. 5811097), OX-40 (Weinberg, A. *et al.* (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero, I. *et al.* (1997) *Nature Medicine* 3: 682-685 (1997), PD-1 (del Rio *et al.* (2005) *Eur J Immunol* 35:3545-60) e ICOS (Hutloff, A. et al (1999) *Nature* 397: 262-266) pueden proporcionar también niveles incrementados de activación de las células T.

El trasplante de médula ósea está siendo utilizado actualmente para tratar una diversidad de tumores de origen hematopoyético. Si bien la enfermedad de rechazo inverso es una consecuencia de este tratamiento, puede obtenerse beneficio terapéutico de las respuestas del injerto frente al tumor. Puede utilizarse el bloqueo de B7-H4 para aumentar la eficacia de las células T específicas del tumor injertadas del donante.

Existen también varios protocolos de tratamiento experimentales que implican activación y expansión ex vivo de células T específicas del antígeno y transferencia adoptiva de estas células a los destinatarios para identificar células T específicas del antígeno contra el tumor (Greenberg, R. & Riddell S. (1999) *Science* 285:546-51). Estos métodos pueden utilizarse también para activar las respuestas de las células T a agentes infecciosos tales como CMV. La activación ex vivo en presencia de anticuerpos anti-B7-H4 puede esperarse que aumente la frecuencia y actividad de las células T transferidas adoptivamente.

Dada la expresión de B7-H4 en diversas células tumorales, los anticuerpos humanos, composiciones de anticuerpos y métodos de la presente descripción pueden utilizarse para tratar un sujeto con un trastorno tumorígeno, v.g., un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan B7-H4 con inclusión, por ejemplo, de cáncer de mama (v.g., carcinoma de células mamarias), cáncer de ovario (v.g., carcinoma de células ováricas), y cáncer renal. Ejemplos de otros cánceres que pueden tratarse utilizando los métodos de la presente descripción incluyen melanoma (v.g., melanoma metastásico maligno), cáncer de próstata, cáncer de colon y cáncer de pulmón, cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de útero, carcinoma de los tubos de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, Enfermedad de Hodgkin, linfoma no-Hodgkin, leucemia linfocítica aguda (ALL), leucemia linfocítica crónica (CLL), linfoma de Burkitt, linfomas anaplásticos de células grandes (ALCL), mieloma múltiple, linfomas cutáneos de células T, linfomas nodulares de células escindidas pequeñas, linfomas linfocíticos, linfomas periféricos de células T, linfomas de Lennert, linfomas inmunoblásticos, leucemia/linfomas de células T (ATLL), leucemia de células T de los adultos (T-ALL), linfomas foliculares (cb/cc)-cánceres entroblásticos-centrocíticos, linfomas difusos de linaje B de células

grandes, linfoma de células T afín a linfoadenopatía angioinmunoblástica (AILD), linfomas asociados a VIH basados en cavidades corporales, carcinomas embrionarios, carcinomas no diferenciados de la rino-faringe (v.g., tumor de Schmincke), enfermedad de Castleman, Sarcoma de Kaposi, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom y otros linfomas de las células B, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias crónicas o agudas con inclusión de leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasma del sistema nervioso central (CNS), linfoma primario del CNS, glioblastoma, tumores cerebrales, carcinomas nasofaríngeos, angiogénesis de tumores, tumor del eje raquídeo, glioma del tallo cerebral, adenoma de la hipófisis, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres inducidos por el medio ambiente con inclusión de los inducidos por asbesto, y combinaciones de dichos cánceres. La presente descripción es útil también para tratamiento de cánceres metastásicos.

De acuerdo con ello, en una realización, esta descripción proporciona un método de inhibición del crecimiento de

células tumorales en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-B7-H4 o porción de fijación de antígeno del mismo. Típicamente, el anticuerpo es un anticuerpo humano anti-B7-H4 (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos anti-B7-H4 humana descritos en esta memoria). Adicionalmente o como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado anti-B7-H4.

Otros métodos de esta descripción se utilizan para tratar pacientes que han estado expuestos a toxinas o patógenos particulares. De acuerdo con ello, otro aspecto de esta descripción proporciona un método de tratamiento de una enfermedad infecciosa en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo anti-B7-H4 o porción de fijación de antígeno del mismo, de tal modo que el sujeto se trata para la enfermedad infecciosa. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano anti-B7-H4 humana (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos anti-B7-H4 descritos en esta memoria). Adicionalmente o como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado.

Análogamente a su aplicación en tumores como se ha descrito arriba, el bloqueo de B7-H4 mediado por anticuerpos puede utilizarse solo o como adyuvante, en combinación con vacunas, para estimular la respuesta inmunitaria a patógenos, toxinas y autoantígenos. Ejemplos de patógenos para los cuales puede ser particularmente útil este enfoque

terapéutico, incluyen patógenos para los cuales no existe actualmente ninguna vacuna eficaz o patógenos para los cuales las vacunas convencionales no son completamente eficaces. Éstas incluyen, pero sin carácter limitante, VIH, hepatitis (A, B y C), gripe, herpes, giardia, malaria, leishmania, Staphylococcus aureus, y Pseudomonas aeruginosa. El bloqueo de PD-1 es particularmente útil contra infecciones establecidas por agentes tales como VIH que presentan antígenos alterados a lo largo del curso de las infecciones. Estos nuevos epítopes son reconocidos como extraños en el momento de la administración de B7-H14 anti-humana, provocando así una respuesta fuerte de las células T que no es amortiguada por señales negativas procedentes de B7-H4.

Algunos ejemplos de virus patógenos causantes de infecciones tratables por los métodos de esta descripción incluyen VIH, hepatitis (A, B o C), herpesvirus (v.g., VZV, HSV-I, HAV-6, HSV-II y CMV, así como el virus de Epstein-Barr), adenovirus, virus de la gripe, flavivirus, ecovirus, rinovirus, virus Coxsackie, cornovirus, virus respiratorio sincitial, virus de las paperas, rotavirus, virus del sarampión, virus de la rubéola, parvovirus, virus vaccinia, virus HTLV, virus del dengue, papilomavirus, virus de molusco, poliovirus, virus de la rabia, virus JC y virus arboviral de la encefalitis.

Algunos ejemplos de bacterias patógenas causantes de infecciones tratables por los métodos de esta descripción

incluyen bacterias clamidia, bacterias rickettsiales, micobacterias, estafilococos, estreptococos, pneumococos, meningococos y gonococos, klebsiella, proteus, serratia, pseudomonas, legionela, difteria, salmonela, bacilos, cólera, tétanos, botulismo, ántrax, peste, leptospirosis y enfermedad de Lyme.

Algunos ejemplos de hongos patógenos causantes de infecciones tratables por los métodos de esta descripción incluyen Candida (albicans, kruzei, glabrata, tropicalis, etc.), Cryptococcus neoformans, Aspergillus (fumigatus, niger, etc.), el género Mucorales (mucor, absidia, rizopus), Sporothrix schenkii, Blastomyces dermatitidis, Paracoccidioides brasiliensis, Coccidioides immitis e Histoplasma capsulatum.

Algunos ejemplos de parásitos patógenos causantes de infecciones tratables por los métodos de esta descripción incluyen Entamoeba histolytica, Balantidium coli, Naegleriafowleri, Acanthamoeba sp., Giardia lambia, Cryptosporidium sp., Pneumocystis carinii, Plasmodium vivax, Babesia microti, Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania donovani, Toxoplasma gondi, Nippostrongylus brasiliensis.

En la totalidad de los métodos anteriores, el bloqueo de B7-H4 puede combinarse con otras formas de inmunoterapia tales como tratamiento con citoquinas (v.g. interferones, GM-CSF, G-CSF, IL-2) o terapia con anticuerpos

biespecíficos, que proporciona una presentación mejorada de antígenos tumorales (véase, v.g., Holliger (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Las reacciones autoinmunes de los anticuerpos anti-B7-H4 pueden provocar y amplificar respuestas autoinmunes. De hecho, la inducción de respuestas anti-tumorales utilizando células tumorales y vacunas peptídicas revela que muchas respuestas antitumorales implican reactividades autoinmunitarias (despigmentación observada en el melanoma B16 modificado con anti-CTLA-4 + GM-CSF en van Elsas *et al.*, supra; despigmentación en ratones vacunados con Trp-2 (Overwijk, W. *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:2982-2987); prostatitis autoinmune provocada por vacunas de células de tumor TRAMP (Hurwitz, A. (2000), supra), vacunación con antígeno peptídico del melanoma y vitíligo observado en pruebas clínicas humanas (Rosenberg, SA y White, DE (1996) *J. Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19(1): 81-4).

Por consiguiente, es posible considerar la utilización del bloqueo de anti-B7-H4 en asociación con diversas autoproteínas con objeto de idear protocolos de vacunación para generar eficientemente respuestas inmunológicas contra estas autoproteínas para tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer implica acumulación inadecuada de péptido Aβ en depósitos de amiloide en el cerebro; las respuestas de anticuerpos contra el amiloide

son susceptibles de aclarar estos depósitos amiloideos (Schenk *et al.*, (1999) Nature 400:173-177).

Otras autoproteínas pueden utilizarse también como dianas tales como IgE para el tratamiento de alergia y asma así como TNFα para la artritis reumatoide. Finalmente, pueden inducirse respuestas de anticuerpos para diversas hormonas por el uso del anticuerpo anti-B7-H4. Las respuestas de anticuerpos neutralizantes para hormonas reproductoras pueden utilizarse para anticoncepción. Respuestas de anticuerpos neutralizantes para hormonas y otros factores solubles que se requieren para el crecimiento de tumores particulares pueden considerarse también como posibles dianas de vacunación. Métodos análogos como los descritos arriba para el uso del anticuerpo anti-B7-H4 pueden utilizarse para inducción de respuestas terapéuticas autoinmunes para tratamiento de pacientes que sufran una acumulación inadecuada de otros autoantígenos, tales como depósitos de amiloide, con inclusión de Aβ en la enfermedad de Alzheimer, citoquinas tales como TNFα e IgE. Pueden utilizarse vacunas anti-anticuerpos B7-H4 para estimular respuestas inmunes específicas de antígeno por coadministración de un anticuerpo anti-B7-H4 con un antígeno de interés (v.g., una vacuna). De acuerdo con ello, en otro aspecto esta descripción proporciona un método de intensificación de una respuesta inmunitaria para un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto: (i) el antígeno; y (ii) un anticuerpo anti-B7-H4 o porción de fijación de antígeno del mismo, tal que se

intensifica una respuesta inmunitaria para el antígeno en el sujeto. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humano anti-B7-H4 humana (tal como cualquiera de los anticuerpos humanos anti-B7-H4 descritos en esta memoria). Adicionalmente o como alternativa, el anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico o humanizado. El antígeno puede ser, por ejemplo, un antígeno tumoral, un antígeno viral, un antígeno bacteriano o un antígeno procedente de un patógeno. Ejemplos no limitantes de tales antígenos incluyen los expuestos en las secciones anteriores, tales como los antígenos tumorales (o vacunas de tumores) expuestos anteriormente o antígenos de los virus, bacterias u otros patógenos descritos anteriormente.

Rutas adecuadas de administración de las composiciones de anticuerpos (v.g., anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas, e inmunoconjugados) de esta descripción in vivo e in vitro son bien conocidas en la técnica y pueden seleccionarse por quienes poseen una experiencia ordinaria. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos pueden administrarse por inyección (v.g., intravenosa o subcutánea). Las dosificaciones adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y el peso del sujeto así como de la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpos.

Como se ha descrito previamente, los anticuerpos humanos anti-B7-H4 de esta descripción pueden coadministrarse con

uno u otros agentes terapéuticos adicionales, v.g., un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresor. El anticuerpo puede estar enlazado al agente (con un inmunocomplejo) o puede administrarse por separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente al agente o puede coadministrarse con otras terapias conocidas, v.g., una terapia anticáncer, v.g., radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásticos tales como doxorrubicina (adriamicina), cisplatino-bleomicina-sulfato, carmustina, clorambucil, descarbazina y ciclofosfamida-hidroxiurea que, en sí mismos, son eficaces solamente a niveles que son tóxicos o subtóxicos para un paciente. El cisplatino se administra por vía intravenosa como una dosis de 100 mg una sola vez cada 4 semanas, y la adriamicina se administra por vía intravenosa como una dosis de 60-75 mg/ml una vez cada 21 días. La coadministración de los anticuerpos humanos anti-B7-H4 o fragmentos de fijación de antígeno de los mismos, de la presente descripción con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticáncer que operan por mecanismos diferentes que proporcionan un efecto citotóxico a las células tumorales humanas. Dicha coadministración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a los fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que podría hacerlas no reactivas con el anticuerpo. Asimismo dentro del alcance de la presente descripción se encuentran kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de esta

descripción (v.g., cuerpos humanos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas o inmunoconjugados) e instrucciones para su empleo. El kit puede contener además como mínimo un reactivo adicional o uno o más anticuerpos humanos adicionales de esta descripción (v.g., un anticuerpo humano que tenga una actividad complementaria que se fije a un epítope en el antígeno B7-H4 distinto del primer anticuerpo humano). Los kits incluyen típicamente una etiqueta que indica el uso propuesto de los contenidos del kit. El término etiqueta incluye cualquier material escrito o registrado suministrado sobre o en el interior del kit o que acompaña de cualquier otro modo al kit.

En una realización, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad hiperproliferativa, que comprende administrar un anticuerpo B7-H4 y un anticuerpo CTLA-4 y/o PD-1 a un sujeto. En realizaciones adicionales, el anticuerpo anti-B7-H4 se administra a una dosis subterapéutica, el anticuerpo anti-CTLA-4 y/o PD-1 se administra a una dosis subterapéutica, o se administran ambos a una dosis subterapéutica. En otra realización, la presente descripción proporciona un método para alterar un suceso adverso asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulante, que comprende administrar un anticuerpo anti-B7-H4 y una dosis subterapéutica de anticuerpo anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1 a un sujeto.

Organización y
Digitalización S.A Ltda

10-79501

Tomo: 2/2

En ciertas realizaciones, el sujeto es humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana 10D1 y el anticuerpo anti-PD-1 es un anticuerpo monoclonal de secuencia humana, tal como 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 y 4A11. El anticuerpo monoclonal de secuencia humana 10D1 ha sido aislado y caracterizado estructuralmente, como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 6984720. Los anticuerpos monoclonales de secuencia humana 17D8, 2D3, 4H1, 5C4 y 4A11 han sido aislados y caracterizados estructuralmente, como se describe en la Patente Provisional U.S. No. 60/679.466.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-B7-H4, anticuerpo anti-CTLA-4 y anti-PD-1 y los anticuerpos de secuencia humana de esta descripción pueden producirse por una diversidad de técnicas, que incluyen metodología convencional de anticuerpos monoclonales, v.g., la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495. Puede emplearse cualquier técnica para producción de anticuerpos monoclonales, v.g., transformación viral u oncogénica de linfocitos B. Un sistema animal para preparación de hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Protocolos y técnicas de inmunización para aislamiento de esplenocitos inmunizados para fusión se conocen en la técnica. Compuestos de fusión asociados (v.g., células de mieloma murino) y procedimientos de fusión son también conocidos (véase, v.g., Harlow y Lane (1988) Antibodies, A Laboratory

Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York). La combinación de anticuerpos es útil para intensificación de una respuesta inmune contra una enfermedad hiperproliferativa por bloqueo de B7-H4 y PD-1 y/o CTLA-4. En una realización preferida, los anticuerpos de la presente descripción son anticuerpos humanos. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, in vitro o ex vivo o a sujetos humanos, v.g., in vivo, para mejorar la inmunidad en una diversidad de situaciones. De acuerdo con ello, en un aspecto, esta descripción proporciona un método de modificación de una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto una combinación de anticuerpos o una combinación de porciones de fijación de antígeno de los mismos, de esta descripción tal que se modifica la respuesta inmune en el sujeto. Preferiblemente, la respuesta se intensifica, estimula o regula en sentido creciente. En otra realización, la presente descripción proporciona un método de alteración de sucesos adversos asociados con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente terapéutico inmunoestimulante, que comprende administrar un anticuerpo anti-B7-H4 y una dosis subterapéutica de anticuerpos anti-CTLA-4 o anti-PD-1 a un sujeto.

El bloqueo de B7-H4, PD-1 y CTLA-4 por anticuerpos puede mejorar la respuesta inmunitaria a las células cancerosas en el paciente. Cánceres cuyo crecimiento puede ser inhibido utilizando los anticuerpos de la presente

descripción incluyen cánceres típicamente sensibles a inmunoterapia. Ejemplos representativos de cánceres para el tratamiento con la terapia de combinación de la presente descripción incluyen melanoma (v.g., melanoma metastásico maligno), cáncer renal, cáncer de próstata, cáncer de colon y cáncer de pulmón. Ejemplos de otros cánceres que pueden tratarse utilizando los métodos de la presente descripción incluyen cáncer de huesos, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma maligno cutáneo o intraocular, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de útero, carcinoma de los tubos de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, Enfermedad de Hodgkin, linfoma no-Hodgkin, cáncer de esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroidea, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la uretra, cáncer del pene, leucemias crónicas o agudas con inclusión de leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasma del sistema nervioso central (CNS), linfoma primario del CNS, angiogénesis de tumores, tumor del eje raquídeo, glioma del tallo cerebral, adenoma de la hipófisis, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, linfoma de células T, cánceres inducidos

por el medio ambiente con inclusión de los inducidos por asbesto, y combinaciones de dichos cánceres. La presente descripción es útil también para tratamiento de cánceres metastásicos.

En ciertas realizaciones, la combinación de anticuerpos terapéuticos expuesta en esta memoria puede administrarse simultáneamente como una sola composición en un vehículo farmacéuticamente aceptable, o simultáneamente como composiciones separadas con cada anticuerpo en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la combinación de anticuerpos terapéuticos puede administrarse secuencialmente. Por ejemplo, un anticuerpo anti-B7-H4 y un anticuerpo anti-PD-1 pueden administrarse secuencialmente, tal como la administración de anti-B7-H4 en primer lugar y anti-PD-1 en segundo lugar, o la administración de anti-PD-1 y anti-B7-H4 en segundo lugar. Adicionalmente, si se administra secuencialmente más de una dosis de la terapia de combinación, el orden de la administración secuencial puede invertirse o mantenerse en el mismo orden en cada momento de administración, pueden combinarse administraciones secuenciales con administraciones simultáneas o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, la primera administración de una combinación de anticuerpo anti-B7-H4 y anticuerpos anti-PD-1 puede ser simultánea, la segunda administración puede ser secuencial con anti-B7-H4 en primer lugar y anti-PD-1 en segundo lugar, y la tercera administración puede ser secuencial con anti-PD-1 en primer lugar y anti-B7-H4 en segundo lugar,

etc. Otro esquema de dosificación representativo puede implicar una primera administración que es secuencial con anti-PD-1 en primer lugar y anti-B7-H4 en segundo lugar y las administraciones subsiguientes pueden ser concurrentes.

Opcionalmente, la combinación de anticuerpos anti-B7-H4 y anti-CTLA-4 y/o antiPD-1 puede combinarse ulteriormente con un agente inmunógeno, tal como células cancerosas, antígenos tumorales purificados (con inclusión de proteínas, péptidos y moléculas de carbohidrato recombinantes), células y células transfectadas con genes que codifican citoquinas inmunoestimulantes (He et al (2004) *J. Immunol.* 173:4919-28). Ejemplos no limitantes de vacunas tumorales que pueden utilizarse incluyen péptidos de antígenos de melanoma, tales como péptidos de gp100, antígenos MAGE, Trp-2, MART1 y/o tirosinasa o células tumorales transfectadas para expresar la citoquina GM-CSF (expuesta con mayor detalle más adelante).

Un bloqueo combinado de B7-H4 y PD-1 y/o CTLA-4 puede combinarse ulteriormente con un protocolo de vacunación. Muchas estrategias experimentales para vacunación contra tumores han sido ideadas (véase Rosenberg, S. (2000) Development de Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C, 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. (2000) ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. (2000) ASCO Educational Book Spring: 730-738; véase también Restifo y Sznol, Cancer Vaccines, Cap. 61, págs. 3023-3043 en De Vita et al

(compiladores), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology. Quinta Edición). En una de estas estrategias, se prepara una vacuna utilizando células tumorales autólogas o alogénicas. Se ha demostrado que estas vacunas celulares alcanzan su máxima efectividad cuando las células tumorales se transducen para expresar GM-CSF. Se ha demostrado que GM-CSF es un activador potente de la presentación de antígeno para la vacunación de tumores (Dranoff *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:3539-43).

Un bloqueo combinado de B7-H4 y PD-1 y/o CTLA-4 puede combinarse también ulteriormente con tratamientos estándar del cáncer. Por ejemplo, un bloqueo combinado de B7-H4 y PD-1 y/o CTLA-4 puede combinarse eficazmente con regímenes quimioterapéuticos. Estos casos, como se observa con la combinación de los anticuerpos anti-B7-H4 y anti-CTLA-4 y/o anti-PD-1, puede ser posible reducir la dosis de otro reactivo quimioterapéutico administrado con una combinación de la presente descripción (Mokyr *et al.* (1998) Cancer Research 58:5303-5304). La base científica racional que subyace en el uso combinado del bloqueo de B7-H4 y PD-1 y/o CTLA-4 con la quimioterapia es que la muerte celular, que es consecuencia de la acción citotóxica de la mayoría de los compuestos quimioterapéuticos, debería dar como resultado niveles incrementados de antígeno tumoral en el camino de presentación de antígeno. Otras terapias de combinación que pueden dar como resultado sinergia con un bloqueo combinado de B7-H4 y PD-1 y/o CTLA-4 por muerte celular incluyen radiación, cirugía o privación de

hormonas. Cada uno de estos protocolos crea una fuente de antígeno tumoral en el hospedador. También pueden combinarse inhibidores de la angiogénesis con un bloqueo combinado de B7-H4 y PD-1 y/o CTLA-4. La inhibición de la angiogénesis conduce a la muerte de las células tumorales, lo cual puede ser también una fuente de antígeno del tumor a alimentar en los caminos de presentación de antígeno del hospedador.

Puede utilizarse también una combinación de anticuerpos bloqueantes de B7-H4 y PD-1 y/o CTLA-4 en combinación con anticuerpos biespecíficos que direccionan las células efectoras que expresan los receptores Fcα o Fcγ a las células tumorales (véanse, v.g., las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5922845 y 5837243). Pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para direccionar dos antígenos separados. Por ejemplo, se han utilizado anticuerpos biespecíficos de antígeno antireceptor Fc/antiantígeno tumoral (v.g. Her-2/neu) para dirigir macrófagos a sitios de tumor. Este direccionamiento puede activar más eficazmente las respuestas específicas de tumores. La rama de las células T de estas respuestas podría incrementarse por el uso de un bloqueo combinado de B7-H4 y PD-1 y/o CTLA-4. Como alternativa, puede suministrarse directamente el antígeno a DCs por el uso de anticuerpos biespecíficos que se fijan al antígeno tumoral y un indicador de la superficie celular específico de células dendríticas. En otro ejemplo, puede utilizarse una combinación de anticuerpos anti-PD-1 y anti-CTLA-4 en asociación con

anticuerpos antineoplásticos, tales como Riruxán® (rituximab), Herceptin® (tratuzumab), Bexxar® (tositumomab), Zevalin® (ibritumomab), Campath® (alemtuzumab), Lynphocide® (eprtuzumab), Avastin® (bevacizumab) y Tarceva® (erlotinib), y análogos. A modo de ejemplo y sin pretender quedar ligados por la teoría, el tratamiento con un anticuerpo anticáncer o un anticuerpo anticáncer conjugado a una toxina puede conducir a la muerte de las células del cáncer (v.g., las células tumorales) lo que podría potenciar una respuesta inmunitaria mediada por B7-H4, CTLA-4 o PD-1. En una realización ilustrativa, un tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa (v.g., un tumor canceroso) puede incluir un anticuerpo anticáncer en combinación con anticuerpos anti-B7-H4 y anti-PD-1 y/o anti-CTLA-4, concurrente o secuencialmente o cualquier combinación de los mismos, lo cual podría potenciar una respuesta inmune antitumoral por el hospedador. Los tumores eluden la vigilancia inmunitaria del hospedador por una gran diversidad de mecanismos. Muchos de estos mecanismos pueden ser contrarrestados por la desactivación de proteínas, que son expresadas por los tumores y que son inmunosupresoras. Éstas incluyen, entre otras, TGF-β (Kehrl, J. *et al.* (1986) *J Exp. Med.* 163: 1037-1050), IL-10 (Howard, M. & O'Garra, A. (1992) *Immunology Today* 13: 198-200) y ligando Fas (Hahne, M. *et al.* (1996) *Science* 274: 1363-1365). En otro ejemplo, anticuerpos para cada una de estas entidades pueden combinarse ulteriormente con una combinación anti-B7-H4 y anti-PD-1 y/o anti-CTLA-4 para contrarrestar los efectos de

los agentes inmunosupresores y favorecer las respuestas inmunitarias antitumorales por el hospedador.

Otros anticuerpos que pueden utilizarse para activar la sensibilidad inmunitaria del hospedador pueden utilizarse ulteriormente en combinación con una combinación anti-B7-H4 y anti-PD-1 y/o anti-CTLA-4. Éstas incluyen moléculas en la superficie de células dendríticas que activan la función de DC y la presentación de antígeno. Los anticuerpos anti-CD40 son capaces de sustituir eficazmente la actividad adyuvante de las células T (Ridge, J. *et al.* (1998) *Nature* 393:474-478) y se ha demostrado que son eficaces en asociación con anti-CTLA-4 (Ito, N. *et al.* (2000) Inmunobiology 201(5) 527-40). La activación de anticuerpos para moléculas coestimulantes de las células T, tales como OX-40 (Weinberg, A. *et al.* (2000) *Immunol* 164: 2160-2169), 4-1BB (Melero, I. *et al.* (1997) Nature Medicine 3: 682-685 (1997), PD-1 (del Rio *et al.* (2005) *Eur J Immunol.* 35:3545-60) e ICOS (Hutloff, A. *et al.* (1999) *Nature* 397: 262-266) puede proporcionar también niveles incrementados de activación de las células T.

El trasplante de médula ósea está siendo utilizado actualmente para tratar una diversidad de tumores de origen hematopoyético. Si bien la enfermedad de rechazo inverso es una consecuencia de este tratamiento, puede obtenerse beneficio terapéutico de las respuestas del injerto frente al tumor. Puede utilizarse un bloqueo combinado de B7-H4 y

PD-1 y/o CTLA-4 para aumentar la eficacia de las células T específicas de tumores injertadas del donante.

Existen también varios protocolos de tratamiento experimentales que implican activación y expansión ex vivo de células T específicas del antígeno y transferencia adoptiva de estas células a los destinatarios para identificar células T específicas de antígeno contra el tumor (Greenberg, R. & Riddell, (1999) Science 285:546-51). Estos métodos pueden utilizarse también para activar las respuestas de las células T a agentes infecciosos tales como CMV. Puede esperarse que la activación ex vivo en presencia de anticuerpos anti-B7-H4 y anti-PD-1 y/o anti-CTLA-4 aumente la frecuencia y actividad de las células T transferidas adoptivamente.

Como se indica en esta memoria, los órganos pueden exhibir sucesos adversos relacionados con la inmunidad después de terapia con anticuerpos terapéuticos inmunoestimuladores, tales como el tracto GI (diarrea y colitis) y la piel (erupción y pruritis) después de tratamiento con anticuerpo anti-CTLA-4. Por ejemplo, se han observado sucesos adversos relacionados con la inmunidad gastrointestinal no concerniente al colon en el esófago (esofagitis), duodeno (duodenitis) e íleon (ileítis) después de tratamiento con anticuerpo anti-CTLA-4.

En ciertas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para alterar un suceso adverso

asociado con el tratamiento de una enfermedad hiperproliferativa con un agente inmunoestimulante, que comprende administrar un anticuerpo anti-B7-H4 y una dosis subterapéutica de anticuerpo anti-CTLA-4 a un sujeto. Por ejemplo, los métodos de la presente descripción proporcionan un método para reducir la incidencia de colitis o diarrea inducida por anticuerpos terapéuticos inmunoestimulantes por administración de un esteroide no absorbible al paciente. Debido a que cualquier paciente que recibe un anticuerpo terapéutico inmunoestimulante corre el riesgo de desarrollar colitis o diarrea inducida por dicho anticuerpo, esta población entera de pacientes es adecuada para terapia de acuerdo con los métodos de la presente descripción. Aunque se han administrado esteroides para tratar la enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) y prevenir las exacerbaciones de la IBD, no se han utilizado los mismos para prevenir (reducir la incidencia de) la IBD en pacientes que no han sido diagnosticados de IBD. Los efectos secundarios importantes asociados con esteroides, incluso esteroides no absorbibles, han hecho desistir de su uso profiláctico.

En reacciones adicionales, una combinación de bloqueo de B7-H4 y PD-1 y/o CTLA-4 (es decir, anticuerpos terapéuticos inmunoestimulantes anti-B7-H4 y anti-PD-1 y/o anti-CTLA-4) puede combinarse adicionalmente con el uso de cualquier esteroide no absorbible. Como se utiliza en esta memoria, un "esteroide no absorbible" es un glucocorticoide que exhibe metabolismo extenso de primer paso de tal manera

que, después del metabolismo en el hígado, la biodisponibilidad del esteroide es baja, es decir, menor que aproximadamente 20%. En una realización de esta descripción, el esteroide no absorbible es budesonida. La budesonida es un glucocorticosteroide de acción local, que se metaboliza extensamente, en primer lugar en el hígado, después de la administración oral. ENTOCORT EC® (Astra-Zeneca) es una formulación oral de budesonida dependiente del pH y del tiempo desarrollada para optimizar el suministro de fármacos al íleon y a lo largo del colon. ENTOCORT EC® está aprobado en los Estados Unidos para el tratamiento de la enfermedad de Crohn leve a moderada que implica el íleon y/o el colon ascendente. La dosis oral usual de ENTOCORT EC® para el tratamiento de la enfermedad de Crohn es 6 a 9 mg/día. ENTOCORT EC® se libera en los intestinos antes de ser absorbido y retenido en la mucosa intestinal. Una vez que pasa a través del tejido diana de la mucosa intestinal, ENTOCORT EC® es metabolizado extensamente por el sistema del citocromo P450 en el hígado para dar metabolitos con actividad glucocorticoide insignificante. Por esta razón, la biodisponibilidad es baja (aproximadamente 10%). La baja biodisponibilidad de budesonida da como resultado una relación terapéutica mejorada en comparación con otros glucocorticoides con metabolismo de primer paso menos extenso. La budesonida da como resultado menos efectos adversos, con inclusión de menos supresión hipotalámico-hipofisaria, que los corticosteroides de acción sistémica. Sin embargo, la administración crónica de ENTOCORT EC® puede dar como

resultado efectos glucocorticoides sistémicos tales como hipercorticismo y supresión adrenal. Véase PDR 58.ª, edición 2004; 608-610.

En otras realizaciones adicionales, una combinación de bloqueo de B7-H4 y PD-1 y/o CTLA-4 (es decir, anticuerpos terapéuticos inmunoestimulantes anti-B7-H4 y anti-PD-1 y/o anti-CTLA-4) en asociación con un esteroide no absorbible puede combinarse ulteriormente con un salicilato. Los salicilatos incluyen agentes 5-ASA tales como, por ejemplo: sulfasalazina (AZULFIDINE®, Pharmacia & UpJohn); olsalazina (DIPENTUM®, Pharmacia & UpJohn); balsalazida (COLAZAL®, Salix Pharmaceuticals, Inc.); y mesalamina (ASACOL®, Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA®, Shire US; CANASA®, Axcan Scandi-pharm, Inc.; ROWASA®, Solvay). De acuerdo con los métodos de la presente descripción, un salicilato administrado en combinación con anticuerpos anti-B7-H4 y anti-PD-1 y/o anti-CTLA-4 y un esteroide no absorbible puede incluir cualquier administración superpuesta o secuencial del salicilato y el esteroide no absorbible para el propósito de reducir la incidencia de colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimulantes. Así, por ejemplo, métodos para reducir la incidencia de colitis inducida por los anticuerpos inmunoestimulantes de acuerdo con la presente descripción abarcan la administración de un salicilato y un esteroide no absorbible simultánea o secuencialmente (v.g., se administra un salicilato 6 horas después de un esteroide no absorbible) o cualquier combinación de los mismos.

Adicionalmente, de acuerdo con la presente descripción, pueden administrarse un salicilato y un esteroide no absorbible por la misma ruta (v.g., se administran ambos por vía oral) o por rutas diferentes (v.g., se administra un salicilato por vía oral y se administra un esteroide no absorbible por vía rectal), que pueden diferir de la o las rutas utilizadas para administrar los anticuerpos anti-B7-H4, anti-PD-1 y/o anti-CTLA-4.

Las composiciones (v.g., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de esta descripción que tienen sitios de fijación de complemento, tales como porciones de IgG1, -2 o -3 o IgM que fijan el complemento, pueden utilizarse también en presencia del complemento. En una realización, el tratamiento ex vivo de una población de células que comprende células diana con un agente de fijación de esta descripción y células efectoras apropiadas puede suplementarse por la adición de complemento o suero que contiene complemento. La fagocitosis de las células diana recubiertas con un agente de fijación de esta descripción puede mejorarse por fijación de proteínas del complemento. En otra realización, células diana recubiertas con las composiciones (v.g., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de esta descripción pueden ser lisadas también por el complemento. En otra realización adicional, las composiciones de esta descripción no activan el complemento.

Las composiciones (v.g., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de esta descripción pueden administrarse también junto con el complemento. De acuerdo con ello, dentro del alcance de esta descripción se encuentran composiciones que comprenden anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones son ventajosas en el sentido de que el complemento está localizado en proximidad estrecha a los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas. Como alternativa, los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas de esta descripción y el complemento o suero pueden administrarse por separado. De acuerdo con ello, los pacientes tratos con composiciones de anticuerpos de esta descripción pueden ser administrados adicionalmente (antes de, simultáneamente con o después de la administración de un anticuerpo humano de esta descripción) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que mejora o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

En otras realizaciones, el sujeto puede tratarse adicionalmente con un agente que modula, v.g., intensifica o inhibe, la expresión o actividad de Fcγ o receptores de Fcγ, por ejemplo por tratamiento de un sujeto con una citoquina. Citoquinas preferidas para administración durante el tratamiento con la molécula multiespecífica incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias granulocitos-

macrófagos (GM-CSF), interferón γ (IFN-γ) y factor de necrosis tumoral (TNF).

Las composiciones (v.g., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de esta descripción pueden utilizarse también para direccionar células que expresan FcγR o B7-H4, por ejemplo para marcar tales células. Para dicho uso, el agente de fijación puede enlazarse a una molécula que pueda ser detectada. Así, esta descripción proporciona métodos para localizar ex vivo o in vitro células que expresan receptores Fc, tales como FcγR o B7-H4. El marcador detectable puede ser, v.g., un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático.

En una realización particular, esta descripción proporciona métodos para detectar la presencia de antígeno B7-H4 en una muestra o medir la cantidad de antígeno B7-H4, que comprende poner en contacto la muestra y una muestra de control, con un anticuerpo humano monoclonal o una porción de fijación de antígeno del mismo, que se fija específicamente a B7-H4, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o porción del mismo y B7-H4. La formación de un complejo se detecta luego, siendo una diferencia de formación de complejo entre la muestra comparada con la muestra de control indicativa de la presencia de antígeno B7-H4 en la muestra.

En otras realizaciones, esta descripción proporciona métodos para tratar un trastorno mediado por B7-H4 en un sujeto.

En otra realización adicional, pueden utilizarse los conjugados anticuerpo-molécula asociada de esta descripción para direccionar compuestos (v.g., agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, inmunosupresores de radiotoxinas, etc.) a células que tienen receptores de la superficie celular de B7-H4 por enlace de tales compuestos con el anticuerpo. Por ejemplo, un anticuerpo anti-B7-H4 puede conjugarse a UPT5 como se describe en las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos Núms. 10/160.972, 10/161.233, 10/161.234, 11/134.826, 11/134.685 y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos Provisional Núm. 60/720.499 y/o cualquiera de los compuestos toxina descritos en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6281354 y 6548530, las Publicaciones de Patente Núms. 20030050331, 20030064984, 20030073852 y 20040087497 o los publicados en WO 03/022806, que se incorporan en esta memoria por referencia en sus totalidades. Así pues, esta descripción proporciona también métodos para localizar ex vivo o in vivo células que expresen B7-H4 (v.g., con un marcador detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático). Como alternativa, los conjugados anticuerpo-molécula asociada puede utilizarse para destruir células que tienen receptores en la superficie celular de B7-H4 por direccionamiento de citotoxinas o radiotoxinas a B7-H4.

La presente descripción se ilustra adicionalmente por los ejemplos que siguen, que no deben interpretarse como limitantes. Los contenidos de todas las figuras y las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas citados a lo largo de esta solicitud se incorporan expresamente en este documento por referencia.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Generación de Anticuerpos Monoclonales Humanos Contra O8E

Este ejemplo describe la generación de anticuerpos monoclonales humanos que se fijan específicamente a O8E humano (conocidos también como B7H4, B7S1 y B7x)

Antígeno

Se transfectaron células CHO y HEK-293 con O8E utilizando métodos estándar recombinantes de transfección y se utilizaron como antígeno para inmunización. Adicionalmente, se utilizó también O8E recombinante sola como antígeno para inmunización.

Ratón HuMAb® y Ratón KM® Transgénicos

Se prepararon anticuerpos monoclonales totalmente humanos para O8E utilizando las variedades HCo7 y HCo12 del ratón transgénico HuMAb® y la variedad KM® de ratones transgénicos transcromosómicos, cada uno de los cuales expresa genes de anticuerpos humanos. En cada una de estas

variedades de ratón, se ha desorganizado homocigóticamente el gen de la cadena ligera kappa endógena de ratón como se describe en Chen *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:811-820 y se ha alterado homocigóticamente el gen de la cadena pesada endógena de ratón como se describe en el Ejemplo 1 de la Publicación PCT WO 01/09187. Cada una de estas variedades de ratón lleva un transgén de cadena ligera kappa humana, KCo5, como se describe en Fishwild *et al.*, (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851. La variedad HCo7 lleva el transgén de la cadena pesada humana HCo7 como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5545806; 5625825; y 5545807. La variedad HCo12 lleva el transgén de la cadena pesada humana HCo12 como se describe en el Ejemplo 2 de la publicación PCT WO01/09187. La variedad de ratón KM® contiene el transcromosoma SC20 como se describe en la publicación PCT WO 02/43478.

Inmunizaciones con HuMAb y KM:

Para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos para O8E, se inmunizaron ratones HuMAb Mouse® y KM Mouse® con células CHO-O8E transfectadas, células HEK 293-O8E transfectadas y/o proteína purificada O8E recombinante. Los esquemas de inmunización generales para HuMAb Mouse® se describen en Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474):856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851 y la publicación PCT WO 98/24884. Los ratones tenían 6-16 semanas de edad en el momento de la primera infusión de antígeno. Se utilizó una preparación

recombinante purificada (5-50 µg) de la proteína O8E para inmunizar los ratones HuMAb® y los ratones KM®.

Se inmunizaron dos veces los ratones transgénicos con antígeno en adyuvante completo de Freund por vía intraperitoneal (IP) o subcutánea (Sc), seguido por inmunización durante 3-21 días por vía IP o SC (hasta un total de 11 inmunizaciones) con el antígeno en adyuvante incompleto de Freund. La respuesta inmunitaria se monitorizó por sangrías retroorbitales. El plasma se cribó por ELISA (como se describe más adelante) y se utilizaron para las fusiones ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-O8E. Los ratones se reforzaron por vía intravenosa con antígeno 3 y 2 días antes del sacrificio y la extirpación del bazo. Típicamente, se realizaron 10-35 fusiones para cada antígeno.
Se inmunizaron varias docenas de ratones para cada antígeno.

Selección de Ratones HuMAb® o ratones KM® productores de anticuerpos anti-O8E:

Para seleccionar ratones HuMAb™ o ratones KM™ productores de anticuerpos que fijaban O8E, los sueros de ratones inmunizados por ELISA se testaron como ha sido descrito por Fishwild, D. *et al.* (1996) (supra). Resumidamente, se revistieron placas de microtitulación con O8E recombinante purificada a 1-2 µg/ml en PBS, se incubaron pocillos de 50 ml a 4°C durante una noche y se bloquearon luego con 200 µl/pocillo de suero de pollo al 5% en PBS/Tween (0,05%). Se

añadieron diluciones de plasma procedente de ratones inmunizados con O8E a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a la temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y se incubaron luego con un anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG Fc humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante una hora a la temperatura ambiente. Después del lavado, se revelaron las placas con sustrato ABTS (Sigma, A-1888, 0,22 mg/ml) y se analizaron por espectrofotometría a DO415-495. Los ratones que desarrollaron los títulos máximos de anticuerpos anti-O8E se utilizaron para fusiones. Las fusiones se realizaron como se describe más adelante y los sobrenadantes de hibridoma se testaron respecto a actividad anti-O8E por ELISA y FACS.

Generación de Hibridomas Productores de Anticuerpos Monoclonales Humanos para O8E:

Los esplenocitos de ratón, aislados de los ratones HuMab™ y ratones KM™, se fusionaron con PEG a una línea de células de mieloma de ratón utilizando PEG basándose en protocolos estándar. Los hibridomas resultantes se cribaron luego en cuanto a la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Se fusionaron suspensiones de células simples de linfocitos esplénicos procedentes de ratones inmunizados con un número 4 veces menor de células de mieloma de ratón SP2/0 no secretantes (ATCC, CRL 1581) con PEG al 50% (Sigma). Las células se extendieron en placas a aproximadamente $1x10^5$ células/pocillo en placas de microtitulación con fondo plano, seguido por una incubación

durante aproximadamente 2 semanas en medio selectivo que contenía 10% de suero bovino fetal (Hyclone, Logan, UT), 10% de medio acondicionado P388DI (ATCC, CRL TIB-63), 3-5% Origén (IGEN) en DMEM (Mediatech, CRL 10013, con L-glutamina y piruvato de sodio rico en glucosa) más HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 mg/ml de gentamicina y 1xHAT (Sigma, CRL P-7185). Después de una a dos semanas, se cultivaron las células en un medio en el cual se había reemplazado HAT con HT. Se cribaron luego los pocillos individuales por ELISA Y FACS (descrito arriba) respecto a anticuerpos IgG monoclonales humanos anti-O8E. Los clones positivos se cribaron luego respecto a anticuerpos positivos para O8E en proteína O8E recombinante por ELISA o en células que expresaban O8E, por ejemplo células CHO-O8E transfectadas, por FACS. Resumidamente, las células que expresaban O8E se recogieron poco antes de los matraces de cultivo de tejidos y se preparó una suspensión de células simples. Las suspensiones de células que expresaban O8E se tiñeron inmediatamente con anticuerpo primario o después de fijación con 1% de paraformaldehído en PBS. Se resuspendieron aproximadamente 1 millón de células en PBS que contenía 0,5% de BSA y 50-200 µg/ml de anticuerpo primario, y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las células se lavaron dos veces con PBS que contenía 0,1% de BSA, 0,01% de NaN_3, se resuspendieron en 100 µl de IgG de cabra antihumana conjugada con FITC y diluida en relación 1:100 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) y se incubaron en hielo durante 30 minutos más. Las células se lavaron de nuevo dos veces, se resuspendieron en 0,5 ml de

tampón de lavado y se analizaron en cuanto a tinción fluorescente en un citómetro FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA).

Una vez que se produjo un crecimiento extenso del hibridoma, se monitorizó el medio usualmente al cabo de 10-14 días. Se reextendieron nuevamente en placas los hibridomas que secretaban anticuerpos, se cribaron de nuevo y, en caso de ser todavía positivos respecto a IgG humana, se subclonaron los anticuerpos monoclonales anti-O8E al menos dos veces por dilución limitante. Los clones estables se cultivaron luego *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejidos para caracterización ulterior.

Los clones de hibridoma 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12 se seleccionaron para análisis ulterior.

EJEMPLO 2

Caracterización Estructural de los Anticuerpos Monoclonales Humanos 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12

Este ejemplo describe el análisis de las secuencias de cinco (5) anticuerpos monoclonales humanos que se fijan específicamente a O8E.

Las secuencias de cDNA que codificaban las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12 se obtuvieron de los hibridomas 1G11, 2A7, 2F9, 12E1 y 13D12,

respectivamente, utilizando técnicas PCR estándar y se secuenciaron utilizando técnicas estándar de secuenciación de DNA.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 1G11 se muestran en la Figura 1A y en SEQ ID NOs: 41 y 1, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 1G11 se muestran en la Figura 1B y en SEQ ID NOs: 46 y 6, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 1G11 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada 1G11 utiliza un segmento VH de la línea germinal humana VH 4-34. La alineación de la secuencia VH de 1G11 con la secuencia de la línea germinal 4-34 de VH se muestra en la Figura 6. El análisis ulterior de la secuencia VH de 1G11 utilizando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR condujo a la delineación de las regiones de cadena pesada CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en las Figuras 1A y 6 y en SEQ ID NOs: 11, 16 y 21, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena ligera de 1G11 respecto a las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera 1G11 utiliza un segmento V_L

de la línea germinal humana VK A27. La alineación de la secuencia V_L de 1G11 con la secuencia de la línea germinal VK A27 se muestra en la Figura 9. El análisis ulterior de la secuencia V_L de 1G11 utilizando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR condujo a la delineación de las regiones de cadena ligera CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en las Figuras 1B y 9 y en SEQ ID NOs: 26, 31 y 36, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 2A7 se muestran en la Figura 2A y en SEQ ID NOs: 42 y 2, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 2A7 se muestran en la Figura 2B y en SEQ ID NOs: 47 y 7, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 2A7 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de 2A7 utiliza un segmento VH de la línea germinal humana VH 3-53 y un segmento JH de la línea germinal humana JH6b. La alineación de la secuencia 2A7 VH con la secuencia VH 3-53 de la línea germinal se muestra en la Figura 7. El análisis ulterior de la secuencia VH de 2A7 utilizando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR condujo a la delineación de las regiones de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CD3 como se

muestra en las Figuras 2A y 7 y en SEQ ID Núms. 12, 17 y 22, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 2A7 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera de 2A7 utiliza un segmento V_L de la línea germinal humana VK A27. La alineación de la secuencia 2A7 VH con la secuencia VK A27 de la línea germinal se muestra en la Figura 9. El análisis ulterior de la secuencia V_L de 2A7 utilizando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR condujo a la delineación de las regiones de la cadena ligera CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en las Figuras 2B y 9 y en SEQ ID Núms. 27, 32 y 37, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 2F9 se muestran en Figura 3A y en SEQ ID NOs: 43 y 3, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 2F9 se muestran en Figura 3B y en SEQ ID NOs: 48 y 8, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 2F9 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocida demostró que la cadena pesada 2F9 utiliza un segmento VH procedente de la línea germinal humana VH 3-53 y un

segmento JH procedente de la línea germinal humana JH6b. La alineación de la secuencia 2F9 de VH con la secuencia de la línea germinal VH 3-53 se muestra en la Figura 7. El análisis ulterior de la secuencia 2F9 VH utilizando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR condujo a la delineación de las regiones de cadena pesada CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en las Figuras 3A y 7 y en SEQ ID NOs: 13, 18 y 23, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 2F9 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera 2F9 utiliza un segmento V_L de la línea germinal humana VK A27. La alineación de la secuencia de 2F9 V_L con la secuencia de la línea germinal VK A27 se muestra en la Figura 9. El análisis ulterior de la secuencia V_L de 2F9 utilizando el sistema Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la delineación de las regiones de cadena ligera CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en las Figuras 3B y 9 y en SEQ ID NOs: 28, 33 y 38, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 12E1 se muestran en la Figura 4A y en SEQ ID NOs: 44 y 4, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 12E1 se muestran en la Figura 4B y en SEQ ID NOs: 49 y 9, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada 12E1 con las secuencias de la cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada 12E1 utiliza un segmento VH de la línea germinal humana VH 3-9, un segmento D de la línea germinal humana 3-10 y un segmento JH de la línea germinal humana JH 6B. La alineación de la secuencia VH de 12E1 con la secuencia de la línea germinal VH3-9 se muestra en la Figura 8. El análisis ulterior de la secuencia 12E1 VH utilizando el sistema Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la delineación de las regiones de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CD3 regiones como se muestra en las Figuras 3A y 8 y en SEQ ID NOs: 14, 19 y 24, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera 12E1 con las secuencias conocidas de la cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana demostró que la cadena ligera 12E1 utiliza un segmento de V_L de la línea germinal humana VK L6 y un segmento JK a partir de la línea germinal humana JK-1. La alineación de la secuencia 12E1 V_L con la secuencia VK L6 de la línea germinal se muestra en la Figura 10. El análisis ulterior de la secuencia 12E1 V_L utilizando el sistema Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la delineación de las regiones de cadena ligera CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en las Figuras 3B y 10 y en SEQ ID NOs: 29, 34 y 39, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de 13D12 se muestran en la Figura 5A y en SEQ ID NOs: 45 y 5, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de 13D12 se muestran en la Figura 5B y en SEQ ID NOs: 50 y 10, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena pesada de 13D12 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena pesada de 13D12 utiliza un segmento VH procedente de la línea germinal humana VH 4-34. La alineación de la secuencia 13D12 VH con la secuencia de la línea germinal VH 4-34 se muestra en la Figura 6. El análisis ulterior de la secuencia 13D12 VH utilizando el sistema Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la delineación de las regiones de cadena pesada CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en las Figuras 5A y 6 y en SEQ ID NOs: 15, 20 y 25, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de la cadena ligera de 13D12 con las secuencias de cadena ligera de inmunoglobulina de la línea germinal humana conocidas demostró que la cadena ligera de 13D12 utiliza un segmento V_L de la línea germinal humana VK A27. La alineación de la secuencia 13D12 V_L con la secuencia de la línea germinal VK A27 se muestra en la Figura 9. El análisis ulterior de la

secuencia 13D12 V_L utilizando el sistema Kabat de determinación de las regiones CDR condujo a la delineación de las regiones de cadena ligera CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en las Figuras 5B y 9 y en SEQ ID NOs: 30, 35 y 40, respectivamente.

EJEMPLO 3

Caracterización de la Especificidad de Fijación de los Anticuerpos Monoclonales Humanos anti-O8E

Este ejemplo describe una comparación de anticuerpos anti-O8E en cuanto a la fijación a O8E inmunopurificada realizada por ELISA estándar para examinar la especificidad de fijación para O8E.

Se recubrió O8E recombinante marcada con His y marcada con myc en una placa durante una noche y se testó luego respecto a fijación contra los anticuerpos monoclonales humanos anti-O8E 2A7, 12E1 y 13D12. Se realizaron procedimientos ELISA estándar. Los anticuerpos monoclonales humanos anti-O8E se añadieron a una concentración de 1 µg/ml y se titularon a diluciones seriadas 1:2. Como anticuerpo secundario se utilizó anticuerpo policlonal IgG antihumana de cabra (específica de la cadena Fc o kappa) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP).

Se purificó B7H4-Ig recombinante a partir de los sobrenadantes de células 293T transfectadas con un constructo B7H4-Ig por cromatografía utilizando proteína A. Se recubrió una placa ELISA con los anticuerpos humanos,

seguido por adición de proteína purificada y detección subsiguiente con los antisueros de conejo anti-B7-H4. Véase la Figura 11A. Se purificó proteína recombinante Penta-B7-H4 con un identificador C-9 a partir de sobrenadantes de células 293T transfectados con un constructo Penta-B7-H4-C9 por cromatografía utilizando una columna de afinidad 2A7. Se recubrió una placa ELISA con Fc anti-ratón, seguido por anti-C9 monoclonal (0,6 µg/ml), se tituló luego Penta-B7-H4 como se ha indicado, y posteriormente los anticuerpos humanos a 1 µg/ml. La placa se recubrió con Fc anti-ratón seguido por M-anti-C9 (0,6 µg/ml), se tituló luego Penta-O8E como se ha indicado, y posteriormente humabs @ 1 µg/ml. Véase la Figura 11B.

Los anticuerpos monoclonales humanos anti-O8E 2A7, 12E1 y 13D12 se fijaban con especificidad alta a O8E.

EJEMPLO 4

Caracterización de la fijación del anticuerpo anti-O8E a O8E expresado en la superficie de líneas de células de carcinoma de cáncer de mama

Este ejemplo describe los tests de anticuerpos anti-O8E para fijación a transfectantes CHO-O8E (conocidos también como B7H4, B7S1 y B7x) y células de carcinoma de células mamarias que expresaban O8E en su superficie celular por citometría de flujo.

Una línea de células CHO transfectada con O8E así como la línea de células de carcinoma de células mamarias SKBR3

(ATCC, No. de Acceso HTB-30) se testaron respecto a fijación de anticuerpos. La fijación del anticuerpo monoclonal humano HuMAb 2A7 anti-O8E se evaluó por incubación de $1x10^5$ células con 2A7 a una concentración de 1 µg/ml. Las células se lavaron y se detectó la fijación con un Ab de IgG antihumano marcado con FITC. Se analizaron análisis citométricos de flujo utilizando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los resultados se muestran en las Figuras 12 y 13.

Estos datos demuestran que los HuMAbs anti-O8E se fijan a las células CHO que expresan O8E y a una línea de células de carcinoma de células mamarias ilustrativa.

EJEMPLO 5

Análisis Scatchard de la afinidad de fijación de los anticuerpos monoclonales anti-O8E

Este ejemplo describe los tests de los anticuerpos monoclonales humanos 1G11, 2F9, 2A7, 12E1 y anticuerpos 13D12 monoclonales respecto a afinidad de fijación a una línea de células HEK transfectada con O8E utilizando un análisis Scatchard.

Se transfectaron células HEK con O8E de longitud total utilizando técnicas estándar y se dejaron crecer en medios RPMI que contenían 10% de suero bovino fetal (FBS). (La Figura 12 presenta el análisis FACs de estas células HEK-O8E con el anticuerpo monoclonal anti-O8E humano 2A7). Las células se tripsinizaron y se lavaron una sola vez en

tampón de fijación basado en Tris (Tris 24 mM de pH 7,2, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, glucosa 2 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, 0,1% de BSA) y las células se ajustaron a $2x10^6$ células/ml en tampón de fijación. Se recubrieron placas Millipore (MAFB NOB) con 1% de leche desnatada seca al 1% en agua y se guardaron a 4°C durante una noche. Las placas se lavaron 3 veces con 0,2 ml de tampón de fijación. Se añadieron 50 microlitros de tampón solo a los pocillos de fijación máxima (fijación total). Se añadieron 25 microlitros de tampón solo a los pocillos de control (fijación inespecífica). Se añadió una concentración variable de anticuerpo ^{125}I-anti-O8E, en un volumen de 25 µl. (En algunos casos se utilizaron anticuerpos marcados con FITC para la titulación, dado que no estaba disponible material sin marcar, en cuyos casos puede verse comprometida la fijación). Se añadieron concentraciones variables de anticuerpos sin marcar con un exceso de 100 veces en un volumen de 25 µl a los pocillos de control y 25 µl de células CHO transfectadas con O8E ($2x10^6$ células/ml) en tampón de fijación. Las placas se incubaron durante 2 horas a 200 rpm en una máquina de sacudidas a 4°C. Una vez completada la incubación, las placas Millipore se lavaron 3 veces con 0,2 ml de tampón de lavado frío (Tris 24 mM de pH 7,2, NaCl 500 mM, KCl 2,7 mM, glucosa 2 mM, $CaCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM, BSA 0,1%.). Se retiraron los filtros y se contaron en un contador gamma. La evaluación de la fijación de equilibrio se realizó utilizando parámetros de fijación de un solo sitio con el software Prism (San Diego, CA).

Se analizaron los datos por regresión no lineal utilizando una respuesta sigmoidal a la dosis (PRIZM™) y dieron como resultado el cálculo de un valor CE_{50}, que se utilizó para clasificar los anticuerpos como se ilustra en la Tabla 2. Los valores CE_{50} calculados en estos experimentos son medidas cualitativas de la afinidad del anticuerpo y no representan afinidades absolutas para O8E.

Tabla 2

Anticuerpo	**CE50**	**CI 95%**
2F9.E6-FITC	407 pM	250 a 663 pM
13D12.G10	746 pM	569 a 979pM
2A7.C11	750 pM	519 pM a 1 nM
1G11.H11-FITC	1,69 nM	1,4 a 2,0 nM
12E1.G9*	19,8 pM	14 a 27,6 nM

* Los valores MÍNIMO y MÁXIMO se ajustaron como constantes para compensar la curva incompleta.

EJEMPLO 6

Internalización del anticuerpo monoclonal anti-O8E

Este ejemplo muestra los tests de HuMAbs anti-O8E en cuanto a la aptitud para internalizarse en CHO y células de carcinoma de mama que expresan O8E utilizando un ensayo de internalización Hum-Zap. El ensayo Hum-Zap testa con respecto a la internalización de un anticuerpo humano primario por fijación de un anticuerpo secundario con afinidad para IgG humana conjugado a la toxina saponina.

La línea de células de carcinoma de mama que expresaba O8E, SKBR3, se sembró a razón de $1,25x10^4$ células/pocillo en pocillos de 100 µl durante una noche. Los anticuerpos HuMAb anti-O8E, 1G11, 2F9, 2A7, 12E1 o 13D12 se añadieron a los pocillos a una concentración de 10 pM. Se utilizó como control negativo un anticuerpo de control isotipo que es inespecífico para O8E. Se añadió el Hum-Zap (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, IT-22-25) a una concentración de 11 nM y se dejaron en incubación las placas durante 72 horas. Se pulsaron luego las placas con 1,0 µCi de ^{3}H-timidina durante 24 horas, se recogieron y se leyeron en un Contador de Centelleo Top Count (Packard Instruments, Meriden, CT). Los resultados se presentan a continuación en la Tabla 3 y las Figuras 14-15. Los anticuerpos anti-O8E 1G11, 2F9, 2A7, 12E1 y 13D12 exhibían una disminución dependiente de la concentración de anticuerpo en la incorporación de ^{3}H-timidina en las células del cáncer de carcinoma de mama SKBR3 que expresaban O8E.

Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-O8E 1G11, 2F9, 2A7, 12E1 y 13D12 se internalizan en una línea de células de cáncer de carcinoma de mama.

Tabla 3

	Ensayo No. 1		Ensayo No. 2		Ensayo No. 3	
	Internalización, %		Internalización, %		Internalización %	
Anti-O8E	media	d.e.	media	d.e.	media	d.e

2A7/C11	29	12	17,5	3,5	40,7	2,7
2F9.E6	37	17	NT	NT	NT	NT
1G11.H1	18	8	NT	NT	NT	NT
13D12.G10	NT	NT	12,1	2,5	12,2	2,8
12E1.G9	NT	NT	10,4	18,5	4,3	2,7

La graduación para la eficiencia de internalización se promedió para tres experimentos en SKBR3 y dos experimentos en CHO-O8E. Los grados de internalización, junto con los valores CE50 para fijación a CHO-O8E, se presentan en las Tablas 4 y 5. Los resultados muestran que la eficiencia de internalización no está correlacionada directamente con la afinidad de fijación, lo que sugiere que la internalización depende del epítope.

Tabla 4

Eficiencia de Internalización Clasificada por Internalización en la Línea de Células de Carcinoma de Mama SBKR3

	Internalización		
Anti-O8E	SKBR3	CHO-O8E	Fijación EC50 CHO-O8E
2F9.E6	1	3	407 pM
2A7.C11	2	1	750 pM
1G11.H1	3	4	1,69 nM
13D12.G10	4	2	746 pM
12E1.G9	5	5	19,8 pM

Tabla 5

Eficiencia de Internalización Clasificada por Internalización en la Línea de Células CHO-O8E

	Internalización		
Anti-O8E	SKBR3	CHO-O8E	Fijación EC50 CHO-O8E
2A7.C11	2	1	750 pM
13D12.G10	4	2	746 pM
2F9.E6	1	3	407 pM
1G11.H1	3	4	1,69 nM
12E1.G9	5	5	19,8 pM

La actividad de internalización de los conjugados de saponina en CHO-O8E se midió con una respuesta a la dosis a lo largo de un intervalo de ~500 pM a 1 pM utilizando anticuerpos monoclonales humanos 2A7, 2F9, y 1G11. Como se ilustra en la Figura 14, la internalización era muy eficiente con valores CE50 en el campo de pM bajo. Se utilizaron como controles negativos una línea de células CHO parental y Hu IgG-SAP y no mostraron toxicidad de fondo significativa alguna o internalización inespecífica. Se utilizaron conjugados anti-O8E directos para SAP, con células SKBR3. El porcentaje de internalización (frente al control) en función de la dosis de Ig-SAP se presenta en la Figura 15.

EJEMPLO 7

Evaluación de la destrucción celular de un anticuerpo anti-O8E conjugado a toxina en líneas de células de carcinoma de células mamarias

Este ejemplo describe los tests de anticuerpos monoclonales anti-O8E conjugados a una toxina en cuanto a la capacidad para destruir una línea de células de carcinoma de células mamarias $O8E^+$ en un ensayo de proliferación celular.

Los anticuerpos HuMAb anti-O8E 1G11, 2F9, 2A7, 12E1 o 13D12 pueden conjugarse a una toxina por un enlazador, tal como un enlazador peptidilo, hidrazona o disulfuro. Se siembra una línea de células de cáncer de carcinoma de mama que expresan O8E, tal como SKBR3, a entre aproximadamente 1 y $3x10^4$ células/pocillo en pocillos de 100 µl durante 3 horas. Se añade a los pocillos un conjugado anticuerpo anti-O8E-toxina, a una concentración inicial de 30 nM y se titula en sentido decreciente a diluciones seriadas 1:3. Como control negativo se utiliza un anticuerpo de control isotipo que es inespecífico para O8E. Se dejan incubar las placas durante 69 horas. Se pulsan luego las placas con 1,0 µCi de ^{3}H-timidina durante 24 horas, se cosechan y se leen en un Contador de Centelleo Top Count (Packard Instruments, Meriden, CT). Se espera que los anticuerpos anti-O8E exhiban una disminución dependiente de la concentración de anticuerpo-toxina en la incorporación de ^{3}H-timidina en las células de cáncer de carcinoma mamario que expresan O8E. Estos datos demuestran que los anticuerpos anti-O8E 1G11, 2F9, 2A7, 12E1 y 13D12 son potencialmente citotóxicos para

las células de cáncer de carcinoma mamario cuando se conjugan a una toxina.

EJEMPLO 8

Evaluación de la actividad ADCC del anticuerpo anti-O8E

Este ejemplo describe los tests de los anticuerpos monoclonales anti-O8E respecto a la capacidad para destruir las líneas de células $O8E^+$ en presencia de células efectoras por la vía de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) en un ensayo de citotoxicidad por fluorescencia.

Se prepararon células efectoras humanas a partir de sangre entera como sigue. Se purificaron células mononucleares de sangre periférica humana de sangre entera heparinizada por separación estándar Ficoll-paque. Se resuspendieron las células en medios RPMI 1640 que contenían FBS al 10% y 200 U/ml de IL-2 humana y se incubaron durante una noche a 37°C. Al día siguiente, se recogieron las células y se lavaron cuatro veces en medios de cultivo, después de lo cual se resuspendieron a $2x10^7$ células/ml. Las células diana $O8E^+$ se incubaron con reactivo BATDA (Perkin Elmer, Wellesley, MA) a 2,5 µl de BATDA por $1x10^6$ células diana/ml durante 20 minutos a 37°C. Las células diana se lavaron 4 veces, se centrifugaron y se llevaron a un volumen final de $1x10^5$ células/ml.

La línea de células SKBR3 $O8E^+$ así como una línea de células SKOV3 transfectada con O8E se testaron respecto a

ADCC específica de anticuerpos para los anticuerpos monoclonales humanos anti-O8E utilizando el análisis de emisión de fluorescencia Delfia como sigue. Cada línea de células diana (100 µl de células diana marcadas) se incubó con 50 µl de células efectoras y 50 µl de anticuerpo. Se utilizó a lo largo de los experimentos una relación de diana a efector de 1:50. En todos los estudios, se utilizó como control negativo un control isotipo de IgG1 humana. Después de una centrifugación de impulsos a 2000 rpm y una hora de incubación a 37°C, se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron de nuevo rápidamente y se transfirieron 20 µl de sobrenadante a una placa de fondo plano, a la que se añadieron 180 µl de solución Eu (Perkin Elmer, Wellesley, MA), y se leyeron en un lector RubyStar (BMG Labtech). El porcentaje de lisis se calculó como sigue: (liberación de la muestra - liberación espontánea * 100)/(liberación máxima - liberación espontánea), donde la liberación espontánea es la fluorescencia de los pocillos que contienen únicamente células diana y la liberación máxima es la fluorescencia de los pocillos que contienen células diana y se han tratado con 2% Triton-X. Los % de lisis por citotoxicidad celular para las células SKBR3 con anticuerpos anti-O8E 1G11, 2F9, y 2A7 se presentan en la Figura 17, los % de lisis por citotoxicidad celular para la línea de células SKOV3 transfectada con O8E con anticuerpos anti-O8E 1G11, 2F9, y 2A7 se presentan en la Figura 18; y los % de lisis por citotoxicidad celular dependiente de la concentración para las células SKBR3 con anticuerpos anti-O8E 2F9 y 2A7 se presentan en la Figura 19. Ambas líneas de

células SKBR3 y SKOV3-O8E que expresaban O8E$^+$ exhibían citotoxicidad mediada por anticuerpos con los anticuerpos HuMAb anti-O8E 1G11, 2F9 y 2A7. Estos datos demuestran que los anticuerpos HuMAb anti-O8E exhiben citotoxicidad específica para las células que expresan O8E$^+$.

EJEMPLO 9

Tratamiento del modelo de aloinjerto de tumores in vivo utilizando anticuerpos anti-O8E desnudos y conjugados con citotoxina

Este ejemplo describe el tratamiento *in vivo* de ratones implantados con un tumor de carcinoma de células mamarias con anticuerpos anti-O8E conjugados con toxina, para examinar el efecto *in vivo* de los anticuerpos sobre el crecimiento tumoral.

Se expanden *in vitro* SKBR3 u otras células adecuadas de carcinoma de células mamarias, utilizando procedimientos estándar de laboratorio. Ratones lampiños atímicos Ncr macho (Taconic, Hudson, NY) entre 6 y 8 semanas de edad se implantan subcutáneamente en el costado derecho con $7,5x10^6$ células ACHN o A-498 en 0,2 ml de PBS/Matrigel (1:1) por ratón. Se pesan los ratones y se miden tridimensionalmente los tumores dos veces por semana utilizando un calibre electrónico después de la implantación. Se calculan los volúmenes de tumor como altura x anchura x longitud. Los ratones con tumores ACHN que tienen como promedio 270 mm^3, o tumores A498 que tienen como promedio 110 mm^3 se distribuyen aleatoriamente en grupos de tratamiento. Los

ratones se dosifican por vía intraperitoneal con vehículo de PBS, anticuerpo de control isotipo conjugado con toxina o HuMAb anti-O8E conjugado con toxina el día 0. Ejemplos de compuestos toxina que pueden conjugarse a los anticuerpos de la presente descripción se describen en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos pendiente de concesión designada MEDX-0034US4. Los ratones que reciben HuMAb anti-O8E se testan con tres compuestos toxina diferentes. Los ratones se monitorizan respecto a crecimiento tumoral durante 60 días después de la dosificación. Los ratones se sacrifican por eutanasia cuando los tumores alcanzan el punto final del tumor (2000 mm^3). Los anticuerpos anti-O8E adecuados conjugados a una toxina prolongan el tiempo medio para alcanzar el volumen de punto final del tumor (2000 mm^3) y ralentizan la progresión del crecimiento del tumor. Así pues, el tratamiento con un conjugado anticuerpo anti-O8E-toxina de este tipo tiene un efecto directo de inhibición *in vivo* sobre el crecimiento del tumor.

EJEMPLO 10

Inmunohistoquímica con HuMAb 2A7 anti-O8E

Este ejemplo demuestra que el HuMAb 2A7 anti-O8E reconoce O8E por inmunohistoquímica utilizando series de tejidos de ratón normales (IMGENEX Histo-Array; Imgenex Corp., San Diego, CA).

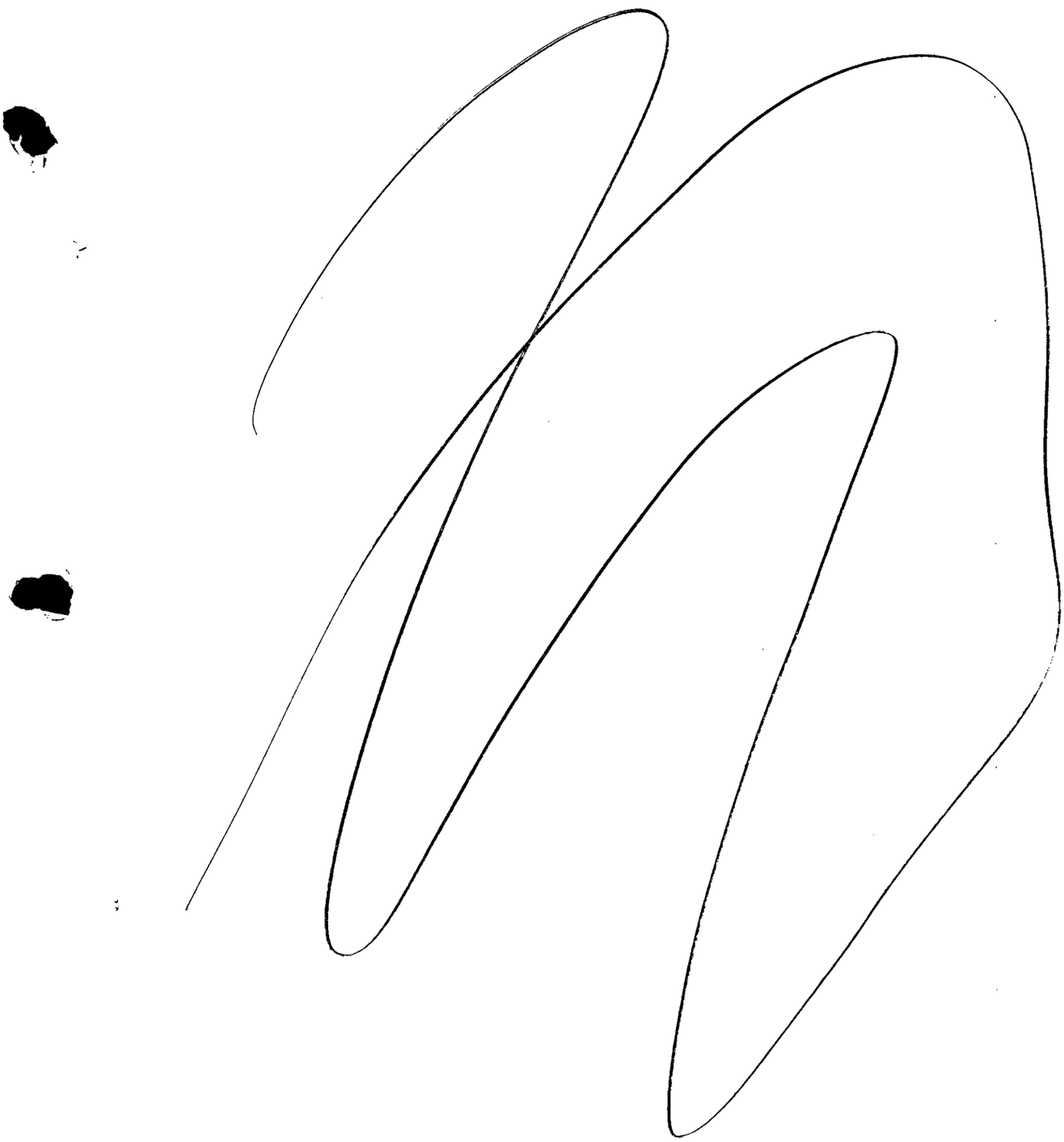
Se utilizaron para la inmunohistoquímica núcleos de tejido de 2000 µm. Después de secado durante 30 minutos, se fijaron las secciones en acetona (a la temperatura ambiente

durante 10 minutos) y se secaron al aire durante 5 minutos. Los portaobjetos se lavaron en PBS y se preincubaron después con 10% de suero normal de cabra en PBS durante 20 minutos, después de lo cual se incubaron con 10 µg/ml de 2A7 FITCilado en PBS con 10% de suero normal de cabra durante 30 min a la temperatura ambiente. A continuación, se lavaron 3 veces los portaobjetos con PBS y se incubaron durante 30 min con anti-FITC de ratón (10 µg/mol, DAKO) a la temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo los portaobjetos con PBS y se incubaron con conjugado cabra anti-HRP de ratón (DAKO) durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo los portaobjetos 3x con PBS. Se utilizó como sustrato diaminobencidina (Sigma), dando como resultado una coloración parda. Después de lavado con agua destilada, se sometieron a contratinción los portaobjetos con hematoxilina durante 1 min. Subsiguientemente, se lavaron los portaobjetos durante 10 s en agua destilada corriente y se montaron en glicergel (DAKO). Los resultados de estos estudios se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6

Inmunoselectividad de O8E en una Serie de Tejidos de Ratón Normal

Tipos de tejido	**2A7.C11 –FITC**	Hu-IgG1-FITC	
	2 µg/ml	**5 µg/ml**	**5 µg/ml**
Piel, lóbulo de la oreja			
Epidermis	–	±	–
Glándula sebácea	–	±	–
Otros elementos	–	–	–
Colon			
Epitelio superficial	±, 1+	1+	±
Otros elementos	–	–	–
Intestino delgado			
Epitelio críptico	±, 1+	1+, 2+	±
Otros elementos	–	–	–
Estómago			
Células epiteliales superficiales y glandulares	1+, 2+, ocas	1+, 2+, freq	1+, 2+, ocas
Plexo de nervios	–	±, 1+	–
Otros elementos	–	–	–
Páncreas			
Epitelio acinar	1+	2+	±, 1+
Islotes	–	±	–
Otros elementos	–	–	–
Glándula salivar			
Epitelio acinar	±	1+	–
Otros elementos	–	–	–
Hígado			
Hepatocitos	–	±, –	–
Otros elementos			



Tipos de tejido	2A7.C11 –FITC	*Hu-IgG1-FITC*	
Cerebro			
Neuronas	±	2+, 1+,	±, –
Neurópilo/fibras	–, ±	freq	–
		2+, 1+,	
Puente		ocas	
Neuronas	±	±	±
Neurópilo/fibras	±	2+, 1+,	–
		freq	
Cerebelo			
Células de Purkinje	±, 1+	1+	±, –
Materia blanca	–	1+, 2+	–
Otros elementos	–	–	–
Bazo			
Células linfoides grandes en pulpa roja	–	1+, 2+, raro	–
Otros elementos	–	–, ±	–
	–	–	–
Timo	–	–	–
Músculo esquelético	–	–	–
Lengua	–		
Corazón	–	–, ±	–
Pulmón	–	–	–
Corteza renal	–	–, ±	–
Médula renal	–	–	–
Vejiga urinaria			
Epitelio transicional	–	±, 1+	–
Otros elementos			

Vesícula seminal	–	–	–
Epitelio			
Fluido en el lumen	±, –	±	–
Otros elementos	1+	3+	±
	–	–	–

Tipos de tejido	**2A7.C11 -FITC**	*Hu-IgG1-FITC*	
Testículos			
Espermatocitos primarios	–	±, 1+	–
Otros elementos			
	–	–	–
Epidídimo	–	–	–
Útero			
Endometrio/epitelio glandular	–, ±	±	–
Otros elementos	–	–	–
Ovario	–	±	–

Intensidad de inmunorreactividad: +- (dudosa); + (débil) 2+ (moderada); 3+ (fuerte); 4+ (intensa); - (negativo). Freq: frecuente; Ocas: ocasional

Estos datos y los datos correspondientes corregidos para los anticuerpos anti-O8E 1G11 y 2F9, demuestran que estaba presente una inmunorreactividad fuerte a intensa con O8E (3+, 4+) en las células afines enteroendocrinas en el colon y el intestino delgado, así como en el fluido del lumen de

la vesícula seminal; se reveló una inmunorreactividad débil a moderada con O8E (1+, 2+) en las neuronas cerebrales, en los neurópilos y las fibras de cerebro y puente, en la materia blanca del cerebelo, en las células epiteliales criptícas del intestino delgado y en un pequeño número de células linfoides grandes en el bazo; se demostró una inmunorreactividad débil con O8E (1+) en el epitelio superficial del colon, las células de Purkinje en el cerebelo y el epitelio acinar de la glándula salivar y el páncreas; se exhibió una inmunorreactividad con O8E dudosa a débil en el epitelio transicional de la vejiga urinaria, los espermatocitos primarios de los testículos y del plexo nervioso del estómago; y cualesquiera otros órganos exhiben tinción negativa a dudosa, con inclusión de piel, hígado, corazón, pulmón, timo, riñón, útero, ovario, epidídimo, lengua, y músculos esqueléticos.

EJEMPLO 11

Producción de HuMAbs Desfucosilados

Este ejemplo demuestra la producción de HuMAbs anti-O8E que carecen de residuos fucosilo.

Se ha demostrado que los anticuerpos con cantidades reducidas de residuos fucosilo aumentan la capacidad ADCC del anticuerpo. La línea de células CHO Ms704-PF, que carece del gen de fucosiltransferasa FUT 8 (Biowa, Inc., Princeton, NJ), se somete a electroporación con un vector que expresa las cadenas pesada y ligera de un HuMAb anti-O8E. Se seleccionan clones resistentes a fármacos por

crecimiento en medios ExCell 325-PF-CHO (JHR Biosciences, Lenexa, KS) con L-glutamina 6 mM y 500 µg/ml de G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los clones se criban respecto a expresión de IgG por ensayo ELISA estándar. Se producen dos clones separados, B8A6 y B8C11, que tienen tasas de producción que fluctúan desde 1,0 a 3,8 picogramos por célula y por día.

EJEMPLO 12

Evaluación de la actividad de ADCC del anticuerpo anti-O8E desfucosilado

Este ejemplo describe los tests de anticuerpos monoclonales anti-O8E desfucosilados y no desfucosilados en cuanto a la capacidad para destruir las células $O8E^+$ en presencia de células efectoras por la vía de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en un ensayo de citotoxicidad con fluorescencia.

Se desfucosilan anticuerpos monoclonales humanos anti-O8E como se ha descrito arriba. Se preparan células efectoras humanas a partir de sangre entera como sigue. Se purifican células mononucleares de sangre periférica humana a partir de sangre entera heparinizada por separación estándar Ficoll-paque. Las células se suspenden de nuevo en medio RPMI1640 que contiene 10% de FBS (medio de cultivo) y 200 U/ml de IL-2 humana y se incuban durante una noche a 37°C. Al día siguiente, se recogen las células y se lavan una sola vez en medios de cultivo, después de lo cual se resuspenden a razón de 2×10^7 células/ml. Se incuban

células diana O8E$^+$ con reactivo BATDA (Perkin Elmer, Wellesley, MA) a razón de 2,5 µl de BATDA por 1 x 10^6 células diana/ml en medio de cultivo suplementado con probenecid 2,5 mM (medio de ensayo) durante 20 minutos a 37°C. Las células diana se lavan 4 veces en PBS con HEPES 20 mM y probenecid 2,5 mM, se centrifugan y se llevan a un volumen final de 1 x 10^5 células/ml en medio de ensayo.

La línea de células O8E$^+$ ARH-77 (leucemia linfoblástica B humana; ATCC, No. de acceso CRL-1621) se testa en cuanto a ADCC específica de antígeno para el anticuerpo monoclonal anti-O8E humano desfucosilado y no desfucosilado utilizando el análisis de emisión de fluorescencia Delfia como sigue. La línea de células diana ARH77 (100 µl de células diana marcadas) se incuba con 50 µl de células efectoras y 50 µl de anticuerpo 1G11 o 1G11 desfucosilado. Se utiliza una relación de diana a efector de 1:100 en todo el ensayo. Se utiliza como control negativo un control isotipo humano IgG1. Después de una centrifugación a impulsos de 2100 rpm y una hora de incubación a 37°C, se recogen los sobrenadantes, se centrifugan de nuevo rápidamente y se transfieren 20 µl de sobrenadante a una placa de fondo plano, a la cual se añaden 180 µl de solución Eu (Perkin Elmer, Wellesley, MA) y se lee en un vector de placas TRF Fusion Alpha. El porcentaje de lisis se calcula como sigue: (liberación de la muestra - liberación espontánea * 100)/(liberación máxima - liberación espontánea), donde la liberación espontánea es la fluorescencia de los pocillos que contienen únicamente células diana y la liberación

máxima es la fluorescencia de los pocillos que contienen células diana y han sido tratados con 3% de Lysol. La línea de células que expresan O8E$^+$, ARH-77, exhibirá una citotoxicidad mediada por anticuerpos con el anticuerpo HuMAb anti-O8E 1G11 y un porcentaje incrementado de lisis específica asociada con la forma desfucosilada del anticuerpo anti-O8E 1G11. Así pues, los anticuerpos HuMAb y anti-O8E desfucosilados aumentan la citotoxicidad específica para las células que expresan O8E+.

EJEMPLO 13

Determinación de anticuerpos anti-O8E HuMAb por análisis de la tinción con inmuno-fluorescencia

Las líneas de células diana, O8E$^+$ SKBR3 (cáncer de mama humano, ATCC #HTB-30) y ZR-75 (cáncer de mama humano, ATCC #CRL-1500) se utilizaron para testar en cuanto a la internalización de los anticuerpos anti-O8E HuMab 2A7C11, 1G11H1 y 2F9E6 por fijación a las células utilizando tinción con inmuno-fluorescencia.

Las células SKBR3 y ZR-75 (10^4 x 100 µl por pocillo en placas de 96 pocillos), cosechadas a partir de matraces de cultivo de tejidos por tratamiento con 0,25% de tripsina/EDTA, se incubaron con cada uno de los anticuerpos HuMab anti-O8E a 5 µg/ml en tampón FACS (PBS + 5% FBS, medio) durante 30 minutos en hielo. Se utilizó como control negativo un control isotipo IgG1 humano. Después de dos lavados con el medio, las células se resuspendieron en el medio (100 µl por pocillo) y se incubaron luego con

anticuerpo secundario anti-humano de cabra conjugado con PE (Jackson ImmunoResearch Lab) en hielo durante 30 minutos. Después de lavado con el medio, las células se sometieron inmediatamente a la formación de imágenes bajo un microscopio fluorescente (Nikon) a 0 min y se incubaron a 37°C varias veces. Las imágenes de morfología celular y la intensidad de inmuno-fluorescencia de las células teñidas se tomaron en momentos diferentes como se indica en las figuras siguientes. La fluorescencia se observó únicamente en las células teñidas con anticuerpos HuMab anti-O8E. No se detectó fluorescencia alguna con el anticuerpo de control IgG1. Se obtuvieron también resultados similares en los ensayos con anticuerpos HuMab anti-O8E conjugados directamente con FITC.

Los datos de formación de imágenes demostraron la aparición de la fluorescencia sobre la membrana de la superficie celular con los 3 anticuerpos HuMab anti-O8E a los 0 min. En la incubación durante 30 min, la intensidad de la fluorescencia de la membrana disminuía significativamente al tiempo que aumentaba la tinción en el interior de las células. En el punto correspondiente a 120 min, la fluorescencia en la membrana desaparecía y parecía estar presente en su lugar en los compartimientos intracelulares. Los datos demuestran que los anticuerpos HuMab anti-O8E pueden internalizarse específicamente después de fijación a células tumorales endógenas que expresan O8E.

EJEMPLO 14

Eficacia de los anticuerpos anti-O8E en tumores HEK-B7H4 en ratones SCID

En este ejemplo, se tratan ratones SCID implantados con tumores HEK-B7H4 *in vivo* con anticuerpos anti-O8E desnudos para examinar el efecto *in vivo* de los anticuerpos sobre el crecimiento tumoral.

Se utilizaron para estudiar el crecimiento del tumor ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID), que carecen de linfocitos funcionales B y T. Se implantaron subcutáneamente células de la línea de células tumorales HEK transfectadas con B7H4 a razón de cinco millones de células/ratón en Matrigel (50% v/v). Cada ratón recibió un inóculo de 0,2 ml de células el día 0. Los ratones se comprobaron en cuanto a crecimiento del tumor a partir del día 10 y se monitorizaron dos veces por semana en cuanto a crecimiento del tumor durante aproximadamente 6 semanas. Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 130 mm^3, se distribuyeron aleatoriamente los ratones en 3 grupos por volumen de tumor. Los ratones se trataron con 10 mg/kg de anticuerpo anti-O8E 2A7 desnudo, un anticuerpo de control isotipo o tampón de formulación como control negativo. Los animales de dosificaron por inyección intraperitoneal cada 5 días durante 5 inyecciones. Utilizando un calibre electrónico, se midieron tridimensionalmente los tumores (altura x anchura x longitud) y se calculó el volumen de tumor. Se sacrificaron los ratones por eutanasia cuando los tumores alcanzaron un volumen de 1500 mm^3 o exhibían una pérdida de peso superior a 15%. Los resultados se muestran

en la Figura 20. El crecimiento del tumor era inhibido por el tratamiento con el anticuerpo 2A7 anti-O8E. La inhibición mediana del crecimiento del tumor para el grupo tratado con 2A7 era 63% el día 34. Los tumores reanudaron su crecimiento después de parar la dosificación. Estos resultados demuestran que los anticuerpos anti-O8E son eficaces en el tratamiento de los tumores que expresan O8E *in vivo*.

EJEMPLO 15

Preparación del Conjugado B7H4-Anticuerpo-Fármaco:

La conjugación del componente del anticuerpo monoclonal B7H4 y Toxina B se realizó como sigue. El anticuerpo, a ~5 mg/ml en fosfato de Na 100 mM, NaCl 50 mM, DTPA 2 mM, pH 8,0, se tioló con un exceso molar de 7 veces de 2-iminotiolano. La relación de tiolación se dejó transcurrir durante una hora a la temperatura ambiente con mezcladura continua.

Conjugación a Toxina B:

Después de la tiolación, el anticuerpo se intercambió de tampón en tampón de conjugación (HEPES 50 mM, glicina 5 mM, povidona 0,5% (10 K), DTPA 2 mM, pH 5,5) en una columna PD10 (Sephadex G-25). La concentración del anticuerpo tiolado se determinó a 280 nm. La concentración de tiol se midió utilizando el ensayo de ditiodipiridina.

Se añadió un stock 5 mM de MED-Toxina B en un exceso molar de 3 veces por tiol de anticuerpo y se mezcló durante 90

minutos a la temperatura ambiente. Después de la conjugación, se añadió N-etilmaleimida 100 mM en DMSO en un exceso molar de 10 veces de tiol por anticuerpo para extinguir cualesquiera tioles sin reaccionar. Esta reacción de extinción se realizó durante una hora a la temperatura ambiente con mezcladura continua.

Purificación:

El conjugado anticuerpo B7H4-fármaco se filtró a través de un filtro de 0,2 µm antes de la purificación por cromatografía de intercambio de cationes. La columna de Intercambio de Cationes de Alta Resolución SP Sepharose (CEX) se regeneró con 5 CV (volúmenes de columna) de HEPES 50 mM, glicina 5 mM, 0,5% povidona, NaCl 1 mM, pH 5,5. Después de la regeneración, se equilibró la columna con 3 CVs de tampón de equilibración (HEPES 50 mM, glicina 5 mM, 0,5% povidona, pH 5,5). Se cargó el conjugado B7H4-Toxina B y se lavó la columna una sola vez con el tampón de equilibración. El conjugado se eluyó con HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 230 mM, 0,5% povidona, pH 5,5. El producto eluido se recogió en fracciones. La columna se regeneró luego con HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 1 mM, 0,5% povidona, pH 5,5 para eliminar los agregados proteínicos y cualquier Toxina B MEDsin reaccionar.

Las fracciones que contenían el conjugado monómero de anticuerpo se agruparon. Se determinaron la concentración

de conjugado de anticuerpo y las formulaciones de sustitución por medida de la absorbancia a 280 y 340 nm.

Formulación

La agrupación de producto eluido CEX purificado se intercambió de tampón en HEPES 50 mM, glicina 5 mM, NaCl 100 mM, 0,5% povidona, pH 6,0 por diálisis utilizando una membrana 10 MWCO. Después de la diálisis, se determinaron la concentración de conjugado de anticuerpo y las relaciones de sustitución por medida de la absorbancia a 280 y 340 nm.

EJEMPLO 16

Eficacia de los conjugados anticuerpo-fármaco sobre los tumores HEK-B7H4 en ratones SCID

Se realizó como sigue un estudio de aloinjerto HEK293-B7H4. Se implantaron subcutáneamente cinco millones de células HEK293-B7H4 en ratones SCID. Los ratones se asignaron a grupos de tratamiento cuando los tumores excedían de un valor medio de 70 mm^3. Se trataron los ratones con 2A7-Toxina B, control de IgG-Toxina B, o control de vehículo con una sola dosis (0,1 µmol/kg calculada para Toxina B) cuando los tumores excedían de un promedio de 70 mm^3. Se pesaron los ratones y se midieron los tumores tridimensionalmente utilizando un calibre electrónico una vez por semana después de la implantación. Se calcularon los volúmenes de tumor como altura x anchura x longitud divido por 2. Este modelo HEK293-B7H4 expresa niveles altos de B7H4 en la superficie celular. Se utilizan como control

isotipo control de IgG-Toxina B dado que los aloinjertos son negativos para IgG.

Como se ilustra en la Figura 21, mientras que los tumores HEK293-B7H4 crecían bien en los ratones y no había diferencia alguna en el crecimiento de tumor entre el control de vehículo y el control isotipo conjugado con toxina, el tratamiento con 2A7-Toxina B daba como resultado una regresión completa de los tumores en todos los ratones de este grupo. En contraste, la Figura 22 ilustra que no había diferencia alguna en los pesos corporales entre los diversos grupos. De acuerdo con ello, mientras que el direccionamiento de B7H4 en tumores que expresan esta proteína con 2A7-Toxina B causa la regresión completa del tumor en este modelo, este estudio muestra también la ausencia de signos de toxicidad diana por administración de 2A7-Toxina B.

EJEMPLO 17

Inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-O8E

La capacidad del anti-B7H4 HuMab 2A7 para reconocer B7H4 por inmunohistoquímica se examinó utilizando biopsias clínicas de cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, y cáncer de cabeza y cuello.

Para la inmunohistoquímica, se utilizaron secciones congeladas de 5 µm (Ardais Inc., EE.UU.). Después de secar durante 30 minutos, se fijaron las secciones con acetona (a la temperatura ambiente durante 10 minutos) y se secaron al

aire durante 5 minutos. Se enjuagaron los portaobjetos en PBS y se preincubaron luego con 10% de suero normal de cabra en PBS durante 20 min y se incubaron subsiguientemente con 10 µg/ml de anticuerpo FITCilado en PBS con suero normal de cabra al 10% durante 30 min a la temperatura ambiente. A continuación, se lavaron los portaobjetos 3 veces con PBS y se incubaron durante 30 min con anti-FITC de ratón (10 µg/ml, DAKO) a la temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo los portaobjetos con PBS y se incubaron con conjugado anti-HRP de ratón, de cabra (DAKO) durante 30 minutos a la temperatura ambiente. Se lavaron de nuevo los portaobjetos 3x con PBS. Se utilizó como substrato diaminobencidina (Sigma), dando como resultado una coloración parda. Después de lavado con agua destilada, se sometieron los portaobjetos a contratinción con hematoxilina durante 1 min. Subsiguientemente, se lavaron los portaobjetos durante 10 s en agua destilada corriente y se montaron en glicergel (DAKO). La tinción inmunohistoquímica de las biopsias clínicas exhibía tinción positiva en el cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, y muestras de cáncer de cabeza y cuello.

EJEMPLO 18

RT-PCR cuantitativa en tejidos normales y de cáncer

Se cribaron diversas muestras de tejido normal y canceroso respecto a la expresión de mRNA de O8E utilizando PCR con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR). La expresión de mRNA es indicativa de la expresión de la proteína O8E.

Para la RT-PCR cuantitativa, se utilizaron los iniciadores de O8E siguientes: B7-H4.3:AGGATGGAATCCT-GAGCTGCACTT; B7-H4.4: TCCGACAGCTCATCTTTGCC-TTCT proporcionados por Operon (Huntsville, AL). Se utilizaron condiciones estándar de reacción (5 µl de cDNA molde a 1 ng/µl, 0,1 µl del iniciador de aguas arriba a 40 µM, 0,1 µl de iniciador de aguas abajo a 40 µm, 6 µl de mezcla PCR 2X SYBR Green (Applied Biosystems #4367659), y 0,8 µl de agua). Se amplificó el cDNA durante 40 ciclos utilizando condiciones de PCR estándar en un equipo ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los resultados de la RT-PCR cuantitativa se muestran a continuación en la Tabla 7. Las muestran con recuentos no determinados representan valores que eran inferiores a un umbral de fluorescencia. Se demostró que los tumores de mama, ovario y de cabeza y cuello expresan O8E, observándose los niveles de expresión máximos en algunas muestras de cáncer de ovario y de cabeza y cuello. Esto demuestra que hay una expresión incrementada de O8E en las muestras de tumores de mama, ovario y cabeza y cuello con relación al tejido normal.

Tabla 7

Expresión RT-PCR cuantitativa en los tejidos normales de cáncer

Tejido	Recuento	Cantidad
N.Adiposo(#301)	28.953062	25.57793
N.Arterial (#303)	31.856901	3.0423617
N.Vejiga(#257)	30.620392	7.5326214
N.Médula Ósea(#342)	Indeterminado	0
N.Cerebro(#258)	34.33955	0.49280354

N.Mama(#259)	25.63064	292.28528
N.Colon (#261)	Indeterminado	0
N.Esófago(#262)	32.27514	2.2388945
N.Corazón(#125)	Indeterminado	0
N.Riñón(#264)	33.599422	0.8479082
N.Hígado (#266)	Indeterminado	0
N.Pulmón (#268)	32.44523	1.9763907
N.Ganglio Linfático(#315)	Indeterminado	0
N.Ovario(#270)	35.045704	0.29364112
N.Páncreas(#271)	28.446985	37.06916
N.Leucocitos de Sangre Periférica(#302)	34.652363	0.39180183
N.Próstata (#272)	32.635994	1.7184163
N.Retina (#256)	34.70426	0.37717298
N.Músculo Esquelético(#119)	Indeterminado	0
N.Músculo Esquelético(#126)	Indeterminado	0
N.Piel(#273)	Indeterminado	0
N.Médula Espinal(#129)	39.383526	0.01220525
N.Bazo(#274)	Indeterminado	0
N.Estómago(#275)	Indeterminado	0
N.Lengua(#324)	30.956758	5.886249
N.Amígdala(#325)	Indeterminado	0
N.Tráquea(#314)	29.771343	14.03797
Tumor de mama(#176)	33.798374	0.7328206
Tumor de mama(#177)	25.759022	266.02777
Tumor de mama(#178)	28.572468	33.81085
Tumor de mama(#179)	25.31508	368.374
Tumor de mama(#180)	29.323488	19.494516
Tumor de cabeza y cuello(Laringe, #402)	28.116425	47.23582
Tumor de cabeza y cuello(Faringe, #403)	25.776083	262.72076
Tumor de cabeza y cuello(Lengua, #403)	26.950275	111.07142
Tumor de cabeza y cuello(Amígdala, #404)	23.03704	1957.3722
Tumor de Riñón (#167)	27.029814	104.77927
Tumor de Ovario (#187)	25.321087	366.75525
Tumor de Ovario (#188)	22.846964	2250.0833
Tumor de Ovario (#189)	25.079527	437.81958
Tumor de Ovario (#190)	27.964441	52.80399
Tumor de Ovario (#191)	22.686525	2530.9656

SUMARIO DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:	SECUENCIA	SEQ ID NO:	SECUENCIA
1	V_H a.a. 11G1	41	V_H n.t. 11G1
2	V_H a.a. 2A7	42	V_H n.t. 2A7
3	V_H a.a. 2F9	43	V_H n.t. 2F9
4	V_H a.a. 12E1	44	V_H n.t. 12E1
5	V_H a.a. 13D12	45	V_H n.t. 13D12
6	V_L a.a. 11G1	46	V_L n.t. 11G1
7	V_L a.a. 2A7	47	V_L n.t. 2A7
8	V_L a.a. 2F9	48	V_L n.t. 2F9
9	V_L a.a. 12E1	49	V_L n.t. 12E1
10	V_L a.a. 13D12	50	V_L n.t. 13D12
11	V_H CDR1 a.a. 11G1	51	V_H 4-34
12	V_H CDR1 a.a. 2A7	52	V_H 3-53
13	V_H CDR1 a.a. 2F9	53	V_H 3-9/D3-10/JH6b
14	V_H CDR1 a.a. 12E1	54	V_K A27
15	V_H CDR1 a.a. 13D12	55	V_K L6/JK1
16	V_H CDR2 a.a. 11G1	56	B7-H4 humana
17	V_H CDR2 a.a. 2ª7		
18	V_H CDR2 a.a. 2F9	57	Enlazador Peptídico
19	V_H CDR2 a.a. 12E1	58	Enlazador Peptídico
20	V_H CDR2 a.a. 13D12	59	Enlazador Peptídico
		60	Enlazador Peptídico
21	V_H CDR3 a.a. 11G1	61	Enlazador Peptídico
22	V_H CDR3 a.a. 2A7	62	Enlazador Peptídico

23	V_H CDR3 a.a. 2F9	63	Enlazador Peptídico
24	V_H CDR3 a.a. 12E1	64	Enlazador Peptídico
25	V_H CDR3 a.a. 13D12	65	Enlazador Peptídico
		66	Enlazador Peptídico
26	V_L CDR1 a.a. 11G1	67	Enlazador Peptídico
27	V_L CDR1 a.a. 2A7	68	Enlazador Peptídico
28	V_L CDR1 a.a. 2F9	69	Enlazador Peptídico
29	V_L CDR1 a.a. 12E1		
30	V_L CDR1 a.a. 13D12		
31	V_L CDR2 a.a. 11G1		
32	V_L CDR2 a.a. 2A7		
33	V_L CDR2 a.a. 2F9		
34	V_L CDR2 a.a. 12E1		
35	V_L CDR2 a.a. 13D12		
36	V_L CDR3 a.a. 11G1		
37	V_L CDR3 a.a. 2A7		
38	V_L CDR3 a.a. 2F9		
39	V_L CDR3 a.a. 12E1		
40	V_L CDR3 a.a. 13D12		

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo monoclonal humano, o una porción de fijación de antígeno del mismo, en donde el anticuerpo fija B7-H4 humana y el conjugado anticuerpo-molécula asociada exhibe al menos una de las propiedades siguientes:

(a) se fija a B7-H4 humana con una afinidad de 1×10^{-8} M o menos; o

(b) inhibe el crecimiento de las células que expresan B7-H4 *in vivo* cuando se conjuga a una citotoxina.

2. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo exhibe ambas propiedades (a) y (b).

3. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 1, que se fija a B7-H4 humana con una afinidad de 5×10^{-9} M o menos.

4. Un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo monoclonal, o porción de fijación de antígeno del mismo, que fija un epítope en B7-H4 humana reconocido por un anticuerpo de referencia, en donde el anticuerpo de referencia comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6;

(b) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;

(c) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;

(d) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; o

(e) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

5. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo de referencia comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

6. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo de referencia comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

7. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo de referencia comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

8. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo de referencia comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

9. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo de referencia comprende:

una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

10. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 1, que comprende:

(a) una CDR1 de la región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 11;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 16;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 21;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 26;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 31; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 36.

11. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 1, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 12;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 17;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 22;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 27;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 32; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 37.

12. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 1, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 13;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 18;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 23;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 28;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 33; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 38.

13. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 1, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 14;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 19;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 24;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 29;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 34; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 39.

14. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 1, que comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 15;

(b) una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 20;

(c) una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 25;

(d) una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 30;

(e) una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 35; y

(f) una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 40.

15. Un conjugado anticuerpo-molécula asociada que comprende un anticuerpo monoclonal, o porción de fijación de antígeno del mismo, que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 1-5; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NOs: 6-10;

en donde el anticuerpo fija específicamente una proteína B7-H4 humana.

16. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

17. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

18. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

19. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

20. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 15, en donde el anticuerpo, o porción de fijación de antígeno del mismo, comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

21. Una composición que comprende el conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

22. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 1, en donde la molécula asociada es un agente terapéutico.

23. Una composición que comprende el conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 22 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

24. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 22, en donde el agente terapéutico es una citotoxina.

25. Una composición que comprende el conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 24 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

26. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 22, en donde el agente terapéutico es un isótopo radiactivo.

27. Una composición que comprende el conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 17 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

28. Un método de inhibición del crecimiento de una célula tumoral que expresa B7-H4, que comprende poner en contacto la célula tumoral que expresa B7-H4 con el conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 1 de tal modo que se inhibe el crecimiento de la célula tumoral B7-H4.

29. Un método de inhibición del crecimiento de una célula tumoral que expresa B7-H4, que comprende poner en contacto la célula tumoral que expresa B7-H4 con el conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 22 de tal modo que se inhibe el crecimiento de la célula tumoral B7-H4.

30. El método de la reivindicación 29, en donde el agente terapéutico es una citotoxina.

31. El método de la reivindicación 28, en donde la célula tumoral que expresa B7-H4 es una célula tumoral de cáncer de próstata o cáncer de vejiga.

32. El método de la reivindicación 28, en donde la célula tumoral que expresa B7-H4 es un cáncer seleccionado del grupo constituido por cáncer de próstata y de vejiga.

33. Un método del tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto un conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 1 de tal modo que se trata el cáncer en el sujeto.

34. Un método del tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto un anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 22 de tal modo que se trata el cáncer del sujeto.

35. El método de la reivindicación 34, en donde el agente terapéutico es una citotoxina.

36. El método de la reivindicación 34, en donde el cáncer es cáncer de próstata o cáncer de vejiga.

37. El método de la reivindicación 34, en donde el cáncer se selecciona del grupo constituido por cáncer de próstata y cáncer de vejiga.

38. Un conjugado anticuerpo-molécula asociada, que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 conjugado a una molécula asociada, en donde la molécula asociada está conjugada con el anticuerpo por un enlazador químico.

39. El conjugado anticuerpo-molécula asociada de la reivindicación 38, en donde el enlazador químico se selecciona del grupo constituido por enlazadores peptidilo, enlazadores hidrazina, y enlazadores disulfuro.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Medarex, Inc.
King, David

<120> Conjugado Anticuerpo Monoclonal Anti-B7H4-Fármaco y Métodos de Utilización

<130> 0199PC

<140> WO 00/000,000
<141> 2008-11-04

<150> US 60/991693
<151> 2007-11-30

<160> 76

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

Phe Trp Thr Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Arg Leu Ser Ser Trp Ser Asn Trp Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

Ser Val Ile Tyr Gly Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Thr Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Val Ser Arg Asn
20 25 30

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

Ser Val Ile Tyr Gly Ser Gly Arg Thr Asp Cys Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg Asp Gly Asp Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Thr Lys Ala Leu Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Asp Phe Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Ala Val Ser Ser
115 120 125

<210> 5
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Arg Glu Leu Arg Tyr Phe Glu Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

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

<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 7
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

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

Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 8
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

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

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

<210> 9
<211> 103
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100

<210> 10
<211> 108
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

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

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

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp Tyr Phe Trp Thr
1 5

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Ser Asn Tyr Met Asn Trp

1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Asn Tyr Met Asn
1 5

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Asp Tyr Ala Met His
1 5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

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

<210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Val Ile Tyr Gly Ser Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 18
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Val Ile Tyr Gly Ser Gly Arg Thr Asp Cys Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

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

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Leu Ser Ser Trp Ser Asn Trp Ala Phe Glu Tyr
1 5 10

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Asp Thr Tyr Ala Met Asp Val
1 5

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Asp Gly Asp Tyr Gly Met Asp Val
1 5

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Leu Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Asp Phe Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Glu Leu Arg Tyr Phe Glu Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 26
<211> 12
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31

Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Tyr Thr
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Tyr Thr
1 5 10

<210> 39
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Gln Gln Arg Arg Thr
1 5

<210> 40
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr
1 5

<210> 41
<211> 357
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 41
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc
60

acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt gattacttct ggacctggat ccgccagccc
120

ccagggaagg gcctggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaaccac caactacaac
180

ccgtccctca agagtcgagt caccatttca gcagacacgt ccaagaacca gttctccctg
240

aggctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag actcagcagc
300

tggtcgaact gggcctttga gtactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca
357

<210> 42
<211> 345
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 42
gaggtgcagc tggtggagtc tggaggaggc ttgatccagc ctgggggggtc cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctgggtt caccgtcagt agcaactaca tgaactgggt ccgccaggct
120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagtt atttatggca gtggtagaac atattacgca
180

gactccgtga agggccgagt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctt
240

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatacctac
300

gctatggacg tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct cctct
345

<210> 43
<211> 348
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 43
gaggtgcagt tggtggagtc tggaggaggc ttgatccagc ctgggggGTC cctgagactc
60

tcctgtgcag cctctgggtt catcgtcagt agaaactaca tgaactgggt ccgccaggct
120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagtt atttatggca gtggtaggac agactgcgca
180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctt
240

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatggggac
300

tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc acggtcaccg tctcctca
348

<210> 44
<211> 378
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 44
gaagtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc
60

tcctgtgtag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcactgggt ccggcaagct
120

ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attagttgga atagtggtag cataggctat
180

gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat
240

ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac acggccttgt attactgtac aaaagccctc
300

tatggttcgg ggagttctga cttctactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc
360

acggtcgccg tctcctca
378

<210> 45
<211> 366
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 45
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc
60

acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc
120

ccagggaagg ggctggagtg gattgggaaa atcaatcata gcggaagtac caactacaac
180

ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg
240

aaactaaact ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaattacga
300

tattttgaaa actactacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc
360

tcctca
366

<210> 46
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 46
gaaattgtgt tgacgcagtt tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcacctact tagcctggta ccagcagaaa
120

cctggccagg ctcccagggt cctcatctat ggtgcatcca gaagggccac tggcatccca
180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag
240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct cactttcggc
300

ggagggacca aggtggagat caaa
324

<210> 47
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 47
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa
120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag
240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacccat gtacactttt
300

ggccagggga ccaagctgga gatcaaa
327

<210> 48
<211> 327
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 48
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa
120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag
240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacctct gtacactttt
300

ggccagggga ccaagctgga gatcaaa 327

<210> 49
<211> 309
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 49
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct
120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc
180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct
240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtaggacgt tcggccaagg gaccaaggtg
300

gaaatcaaa
309

<210> 50
<211> 324
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 50
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc
60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa
120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca
180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag
240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacctcg gacgttcggc
300

caagggacca aggtggaaat caaa
324

<210> 51
<211> 97
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

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

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

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

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

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

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

Arg

<210> 52
<211> 97
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

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

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

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

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

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

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

Arg

<210> 53
<211> 99
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp

<210> 54
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

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

<210> 55
<211> 94
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp
85 90

<210> 56
<211> 282
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile
1 5 10 15

Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser
20 25 30

Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile
35 40 45

Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu
50 55 60

Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val
65 70 75 80

His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met
85 90 95

Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn
100 105 110

Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr
115 120 125

Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu
130 135 140

Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn
145 150 155 160

Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln
165 170 175

Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser
180 185 190

Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met
195 200 205

Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser
210 215 220

Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val
225 230 235 240

Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser
245 250 255

Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu
260 265 270

Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys
275 280

<210> 57
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

Ala Leu Ala Leu
1

<210> 58
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Xaa es beta-alanina

<400> 58

Xaa Leu Ala Leu
1

<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

Gly Phe Leu Gly
1

<210> 60
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

Leu Leu Gly Leu
1

<210> 61
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Pro Arg Phe Lys
1

<210> 62
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

Thr Arg Leu Arg
1

<210> 63
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

Ser Lys Gly Arg
1

<210> 64
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

Pro Asn Asp Lys
1

<210> 65
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

Pro Val Gly Leu Ile Gly
1 5

<210> 66
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

Gly Pro Leu Gly Val
1 5

<210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

Gly Pro Leu Gly Ile Ala Gly Gln
1 5

<210> 68
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

Pro Leu Gly Leu
1

<210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

Gly Pro Leu Gly Met Leu Ser Gln
1 5

<210> 70
<211> 8

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

Gly Pro Leu Gly Leu Trp Ala Gln
1 5

<210> 71
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

Leu Ser Ser Trp Ser Asn Trp Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ser Ser
20

<210> 72
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

Glu Leu Arg Tyr Phe Glu Asn Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 73
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

Tyr Gly Ser Gly Ser
1 5

<210> 74
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
1 5 10 15

Thr Val Ser Ser
20

<210> 75
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 76
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

Anti-O8E 1G11VH

Segmento V: 4-34
Segmento D: D6-13
Segmento J: JH4b

```
          Q   V   Q   L   Q   Q   W   G   A   G   L   L   K   P   S   E   T   L
  1      CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                                              CDR1
                                                          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
          S   L   T   C   A   V   Y   G   G   S   F   S   D   Y   F   W   T   W
 55      TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GAT TAC TTC TGG ACC TGG

                                                                  CDR2
                                                              ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
          I   R   Q   P   P   G   K   G   L   E   W   I   G   E   I   N   H   S
109      ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT

                     CDR2
         ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
          G   T   T   N   Y   N   P   S   L   K   S   R   V   T   I   S   A   D
163      GGA ACC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATT TCA GCA GAC

          T   S   K   N   Q   F   S   L   R   L   S   S   V   T   A   A   D   T
217      ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AGG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                                     CDR3
                                     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
          A   V   Y   Y   C   A   R   L   S   S   W   S   N   W   A   F   E   Y
271      GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA CTC AGC AGC TGG TCG AAC TGG GCC TTT GAG TAC
                             |   D6-13/DN1   |         |
                             |_______________|         |__>     JH4b

          W   G   Q   G   T   L   V   T   V   S   S
325      TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Figura 1A

Anti-O8E 1G11VK

Segmento V: A27
Segmento J: JK4

```
      E   I   V   L   T   Q   F   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1     GAA ATT GTG TTG ACG CAG TTT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   T   Y   L   A   W
55    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC ACC TAC TTA GCC TGG

                                                                CDR2
                                                                ~~~~~~~~~~~~~~~~
      Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   V   L   I   Y   G   A   S   R
109   TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG GTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGA

      CDR2
      ~~~~~~~~~~~~~
      R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163   AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                                                    CDR3
                                                                    ~~~
      T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217   ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

                  CDR3
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      Q   Y   G   S   S   P   L   T   F   G   G   G   T   K   V   E   I   K
271   CAG TAT GGT AGC TCA CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA
                  └──► JK4
```

Figura 1B

Anti-O8E 2A7VH

Segmento V: 3-53
Segmento D: No encontrado
Segmento J: JH6b

```
      E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   I   Q   P   G   G   S   L
1     GAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGA GGA GGC TTG ATC CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                                        CDR1
                                                        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      R   L   S   C   A   A   S   G   F   T   V   S   S   N   Y   M   N   W
55    AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGG TTC ACC GTC AGT AGC AAC TAC ATG AAC TGG

                                                            CDR2
                                                            ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   V   I   Y   G   S
109   GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GTT ATT TAT GGC AGT

                    CDR2
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      G   R   T   Y   Y   A   D   S   V   K   G   R   V   T   I   S   R   D
163   GGT AGA ACA TAT TAC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA GTC ACC ATC TCC AGA GAC

      N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D   T
217   AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG

                                        CDR3
                                        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      A   V   Y   Y   C   A   R   D   T   Y   A   M   D   V   W   G   Q   G
271   GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT ACC TAC GCT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG
                                  └──► JH6b

      T   T   V   T   V   S   S
325   ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCT
```

Figura 2A

Anti-O8E 2A7VK

Segmento V: A27
Segmento J: JK2

```
      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1     GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                            ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L   A   W
55    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                                                CDR2
                                                            ~~~~~~~~~~~~~~~~
      Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109   TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR2
      ~~~~~~~~~~~~
      R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163   AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                                                        CDR3
                                                                        ~~~
      T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217   ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

                    CDR3
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      Q   Y   G   S   S   P   M   Y   T   F   G   Q   G   T   K   L   E   I
271   CAG TAT GGT AGC TCA CCC ATG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC
                            └──► JK2
      K
325   AAA
```

Figura 2B

Anti-O8E 2F9VH

Segmento V: VH3-53
Segmento D: D5-24
Segmento J: JH6b

```
        E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   I   Q   P   G   G   S   L
  1     GAG GTG CAG TTG GTG GAG TCT GGA GGA GGC TTG ATC CAG CCT GGG GGG TCC CTG

                                                        CDR 1
                                                        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        R   L   S   C   A   A   S   G   F   I   V   S   R   N   Y   M   N   W
 55     AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGG TTC ATC GTC AGT AGA AAC TAC ATG AAC TGG

                                                            CDR 2
                                                            ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   V   I   Y   G   S
109     GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GTT ATT TAT GGC AGT

                    CDR 2
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        G   R   T   D   C   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R   D
163     GGT AGG ACA GAC TGC GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC

        N   S   K   N   T   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D   T
217     AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTT CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC ACG

                                    CDR 3
                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        A   V   Y   Y   C   A   R   D   G   D   Y   G   M   D   V   W   G   Q
271     GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GGG GAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA
                        D5-24                       JH6b
        G   T   T   V   T   V   S   S
325     GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Figura 3A

Anti O8E 2F9VK

Segmento V: A27
Segmento J: JK2

```
      E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1     GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                              CDR 1
                          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L   A   W
55    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                                              CDR 2
                                                          ~~~~~~~~~~~~~~~~
      Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109   TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

      CDR 2
      ~~~~~~~~~~~~
      R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163   AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                                                  CDR 3
                                                                  ~~~
      T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217   ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

                  CDR 3
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      Q   Y   G   S   S   P   L   Y   T   F   G   Q   G   T   K   L   E   I
271   CAG TAT GGT AGC TCA CCT CTG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC

                        └→ JK2
      K
325   AAA
```

Figura 3B

Anti-O8E 12E1 VH

Segmento V: 3-9
Segmento D: 3-10
Segmento J: JH6b

```
       E   V   Q   L   V   E   S   G   G   G   L   V   Q   P   G   R   S   L
1     GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGC AGG TCC CTG

                                                           CDR1
                                                       ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       R   L   S   C   V   A   S   G   F   T   F   D   D   Y   A   M   H   W
55    AGA CTC TCC TGT GTA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT GCC ATG CAC TGG

                                                               CDR2
                                                           ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       V   R   Q   A   P   G   K   G   L   E   W   V   S   G   I   S   W   N
109   GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATT AGT TGG AAT

                   CDR2
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       S   G   S   I   G   Y   A   D   S   V   K   G   R   F   T   I   S   R
163   AGT GGT AGC ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

       D   N   A   K   N   S   L   Y   L   Q   M   N   S   L   R   A   E   D
217   GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG GAC

                                                      CDR3
                                               ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       T   A   L   Y   Y   C   T   K   A   L   Y   G   S   G   S   S   D   F
271   ACG GCC TTG TAT TAC TGT ACA AAA GCC CTC TAT GGT TCG GGG AGT TCT GAC TTC →

      JH6b
           CDR3
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       Y   Y   Y   G   M   D   V   W   G   Q   G   T   T   V   A   V   S   S
325   TAC TAC TAC GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC GCC GTC TCC TCA
```

Figura 4A

Anti-O8E 12E1 VK

Segmento V: L6
Segmento J: JK1

```
      E   I   V   L   T   Q   S   P   A   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1     GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                            ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   Y   L   A   W   Y
55    GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

                                                                CDR2
                                                            ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   D   A   S   N   R
109   CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

      CDR2
      ~~~~~~~
      A   T   G   I   P   A   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F   T
163   GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

                                                                    CDR3
                                                                ~~~~~~~~
      L   T   I   S   S   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q   Q
217   CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

      CDR3
      ~~~~~~~~~~~~
      R   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271   CGT AGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
        └──►
          JK1
```

Figura 4B

Anti-O8E 13D12 VH

Segmento V: 4-34
Segmento D: 3-9
Segmento J: JH6b

```
      Q   V   Q   L   Q   Q   W   G   A   G   L   L   K   P   S   E   T   L
1     CAG GTG CAG CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC CTG

                                                        CDR1
                                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      S   L   T   C   A   V   Y   G   G   S   F   S   G   Y   Y   W   S   W
55    TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG

                                                            CDR2
                                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      I   R   Q   P   P   G   K   G   L   E   W   I   G   K   I   N   H   S
109   ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG AAA ATC AAT CAT AGC

                      CDR2
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      G   S   T   N   Y   N   P   S   L   K   S   R   V   T   I   S   V   D
163   GGA AGT ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

      T   S   K   N   Q   F   S   L   K   L   N   S   V   T   A   A   D   T
217   ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAA CTA AAC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

                                        CDR3
                                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      A   V   Y   Y   C   A   R   E   L   R   Y   F   E   N   Y   Y   Y   G
271   GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAA TTA CGA TAT TTT GAA AAC TAC TAC TAC GGT
                                                        ↳
                                                        JH6b
      CDR3
      ~~~~~~~~~~~~
      M   D   V   W   G   Q   G   T   T   V   T   V   S   S
325   ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA
```

Figura 5A

Anti-O8E 13D12 VK

Segmento V: A27
Segmento J: JK1

```
   E   I   V   L   T   Q   S   P   G   T   L   S   L   S   P   G   E   R
1  GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

                                CDR1
                    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
   A   T   L   S   C   R   A   S   Q   S   V   S   S   S   Y   L   A   W
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA GCC TGG

                                                            CDR2
                                                            ~~~~~~~~~~~~~~~~
   Y   Q   Q   K   P   G   Q   A   P   R   L   L   I   Y   G   A   S   S
109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC

    CDR2
    ~~~~~~~~~~~~
   R   A   T   G   I   P   D   R   F   S   G   S   G   S   G   T   D   F
163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC

                                                                CDR3
                                                                ~~~
   T   L   T   I   S   R   L   E   P   E   D   F   A   V   Y   Y   C   Q
217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG

            CDR3
    ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
   Q   Y   G   S   S   P   R   T   F   G   Q   G   T   K   V   E   I   K
271 CAG TAT GGT AGC TCA CCT CGG ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA
                    └►
                    JK1
```

Figura 5B

Regiones Anti-O8E 1G11 y 13D12 VH

```
                                                                  __CDR1___
4-34 línea germinal   Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S W
I R
1G11 VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D - F - T -
- -
13D12 VH              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
- -

                                     ____________CDR2_______________
4-34 línea germinal   Q P P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S
K N
1G11 VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - T - - - - - - - - - - - - - - A - - -
- -
13D12 VH              - - - - - - - - - - - K - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
- -

                                                         __________CDR3_____________
4-34 línea germinal   Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R
1G11 VH               - - - - R - - - - - - - - - - - - - - - - * L S S W S N * * W A F E Y W G Q G
T L
13D12 VH              - - - - - - N - - - - - - - - - - - - - E - R Y F E - Y Y Y G M D V - - - -
- T

1G11 VH          V T V S S
13D12 VH:        - - - - -
```

Nota: * = una laguna, y no existe ningún aminoácido en esta posición.

Figura 6

354

Regiones Anti-O8E 2A7 y 2F9 VH

```
                                                        CDR1
3-53 línea germinal  E V Q L V E S G G G L I Q P G G S L R L S C A A S G F T V S S N Y M S W
V R
2A7 VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - N -
- -
2F9 VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - I - - R - - - N -
- -

                                         CDR2
3-53 línea germinal  Q A P G K G L E W V S V I Y S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S
K N
2A7 VH               - - - - - - - - - - - - - - G S - R - - - - - - - - - - V - - - - - - -
- -
2F9 VH               - - - - - - - - - - - - - - G S - R - D C - - - - - - - - - - - - - - -
- -

                                                   CDR3
3-53 línea germinal  T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
JH6b línea germinal                                         Y G M D V W G Q G T T V T V
S S
2A7 VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D T * - A - - - - - - - - - -
- -
2F9 VH               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - D G D - - - - - - - - - - - -
- -
```

Nota: * = una laguna, y no existe ningún aminoácido en esta posición.

Figura 7

355

Región Anti-08E 12E1 VH

```
                                                                  CDR1
3-9 línea germinal:  E V Q L V E S G G G L V Q P G R S L R L S C A A S G F T F D D Y A
M H
12E1 VH:             - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - V - - - - - - - - - -
- -

                                                  CDR2
3-9 línea germinal:  W V R Q A P G K G L E W V S G I S W N S G S I G Y A D S V K G R F
T I
12E1 VH:             - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
- -

CDR3
3-9 línea germinal:      S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A L Y Y C A K D

D 3-10 línea germinal:                                                       Y G S
G S
12E1 VH:             - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - T - A L - - -
- -

                  CDR3
JH6b  línea germinal:     Y Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S
12E1 VH:                    S D F - - - - - - - - - - - - - - - A - - - (JH6b)
```

Figura 8

Regiones Anti-O8E 1G11, 2A7, 2F9, y 13D12 VK

```
                                                               ________CDR1__________
A27 línea germinal   E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
1G11 VK              - - - - - - F - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - T - - - -
2A7 VK               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2F9 VK               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
13D12 VK:            - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
-

                                               _____CDR2____
A27 línea germinal   Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F
1G11 VK              - - - - - - - - - - V - - - - - - R - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2A7 VK               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
2F9 VK               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
13D12 VK:            - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
-

                                                     ______CDR3________
A27 línea germinal   T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P
1G11 VK              - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - L * T F G G G T K V E I
K
2A7 VK               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - M Y - - - Q - - - L - -
-
2F9 VK               - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - Y - - - Q - - - L - -
-
13D12 VK:            - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - R * - - - Q - - - - - -
-
```

Nota: * = una laguna, y no existe ningún aminoácido en esta posición.

Figura 9

Región Anti-O8E 12E1 VK

CDR1

L6 línea germinal: E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A

12E1 VK: -

CDR2

L6 línea germinal: W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G

12E1 VK: -

CDR3

L6 línea germinal: T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N W

JK1 línea germinal: - T F G Q G T K V

12E1 VK: - R * * - - - - - - - -

JK1 línea germinal: E I K

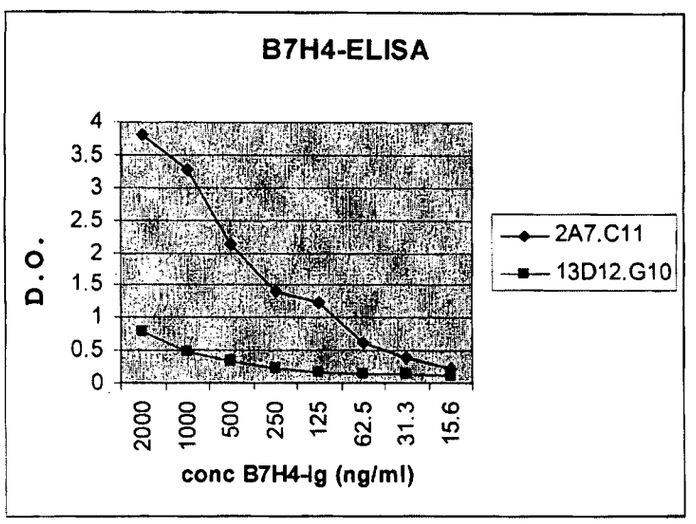
12E1 VK: - - -

Nota: * = una laguna, y no existe ningún aminoácido en esta posición.

Figura 10

258

A


B7H4-ELISA
D.O.
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
2000
1000
500
250
125
62.5
31.3
15.6
conc B7H4-Ig (ng/ml)
2A7.C11
13D12.G10

B

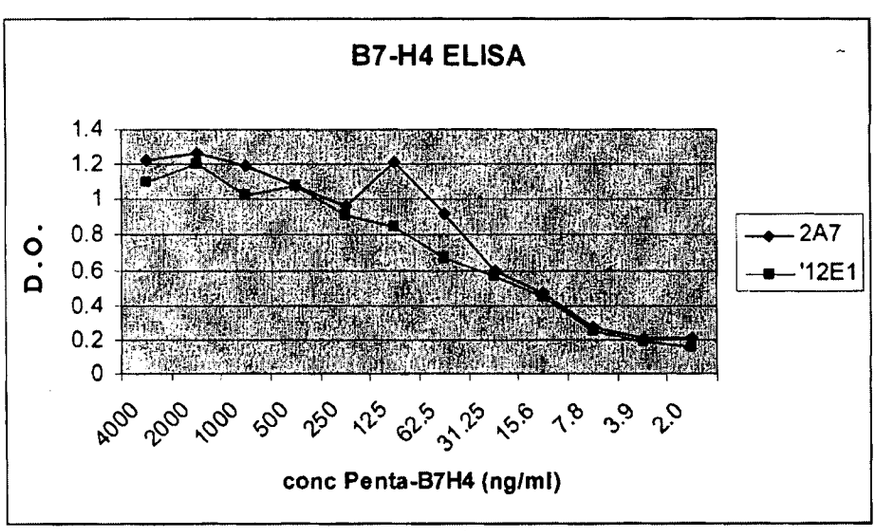
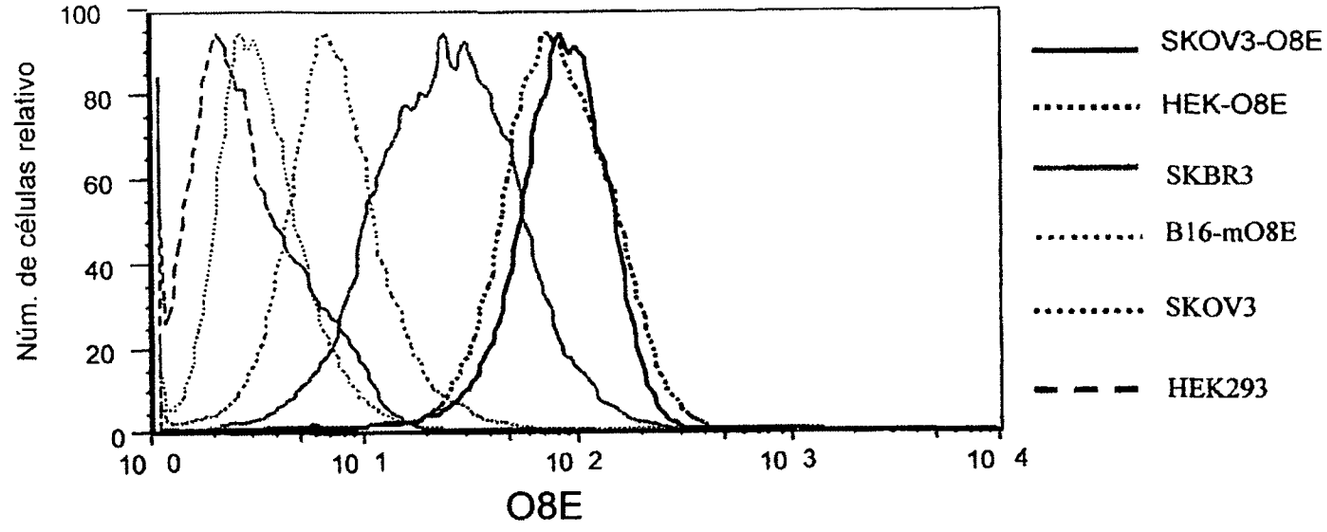

B7-H4 ELISA
D.O.
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
4000
2000
1000
500
250
125
62.5
31.25
15.6
7.8
3.9
2.0
conc Penta-B7H4 (ng/ml)
2A7
'12E1

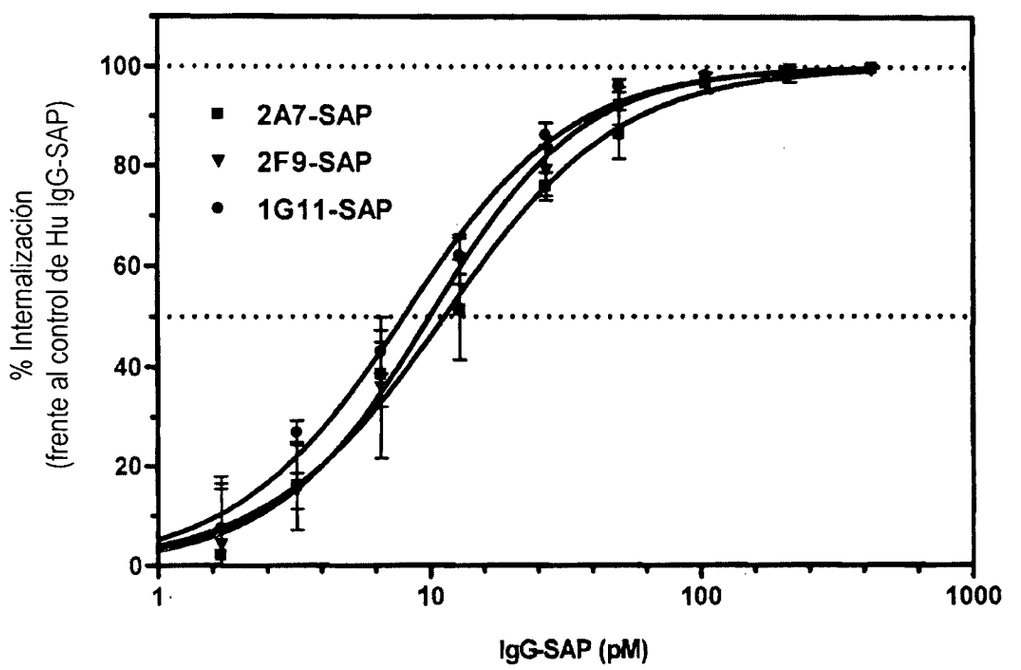
Figura 11

Figura 13



360

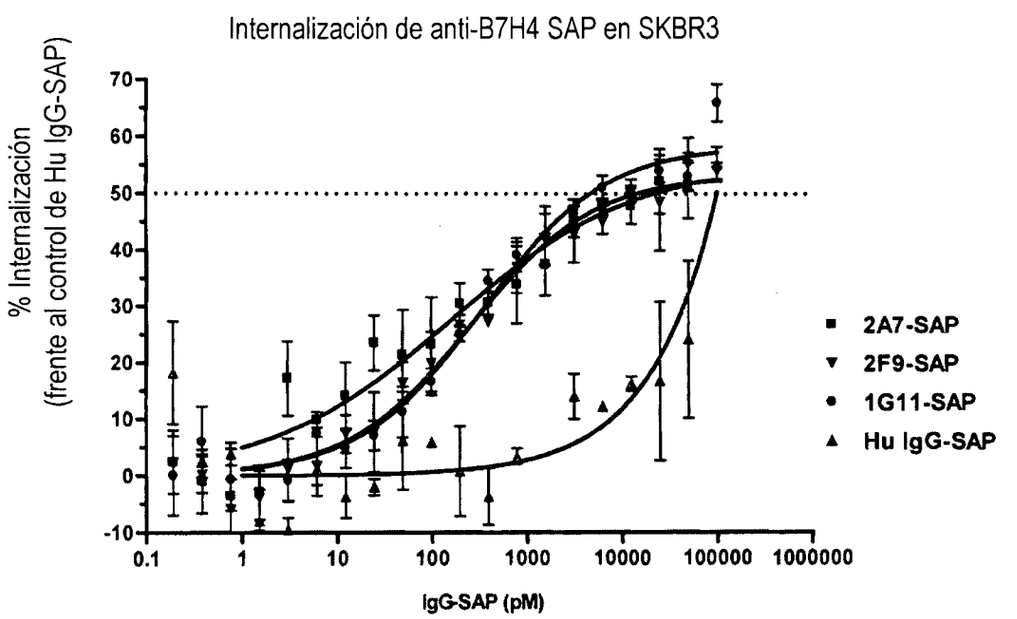
Internalización de anti-B7H4 SAP en transfectantes CHO-B7H4



	2A7-SAP	2F9-SAP	1G11-SAP
EC50	11.32	9.981	8.013

Figura 14

Figura 15



	2A7-SAP	2F9-SAP	1G11-SAP
EC50	161.1	255.5	334.7

Figura 16

Mapeado de epítope(s) de O8E con HuMabs

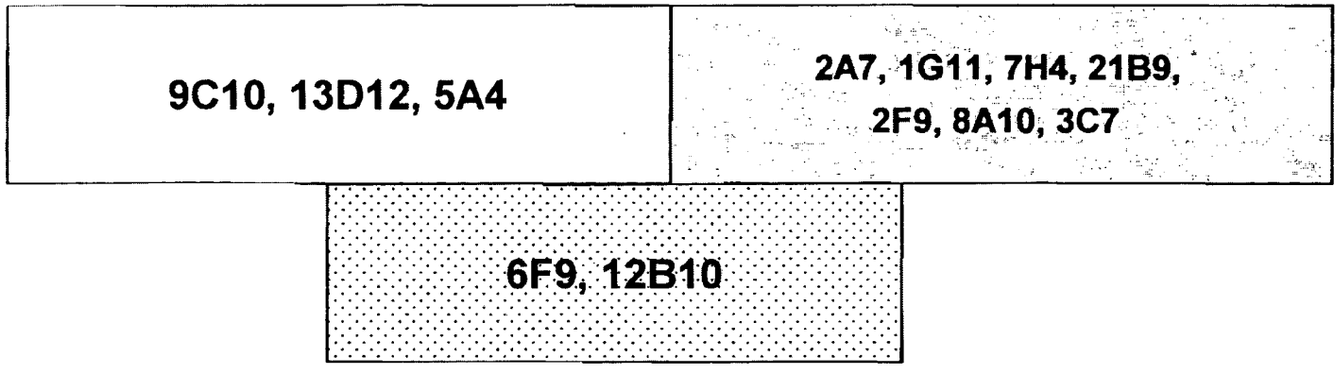


Figura 17

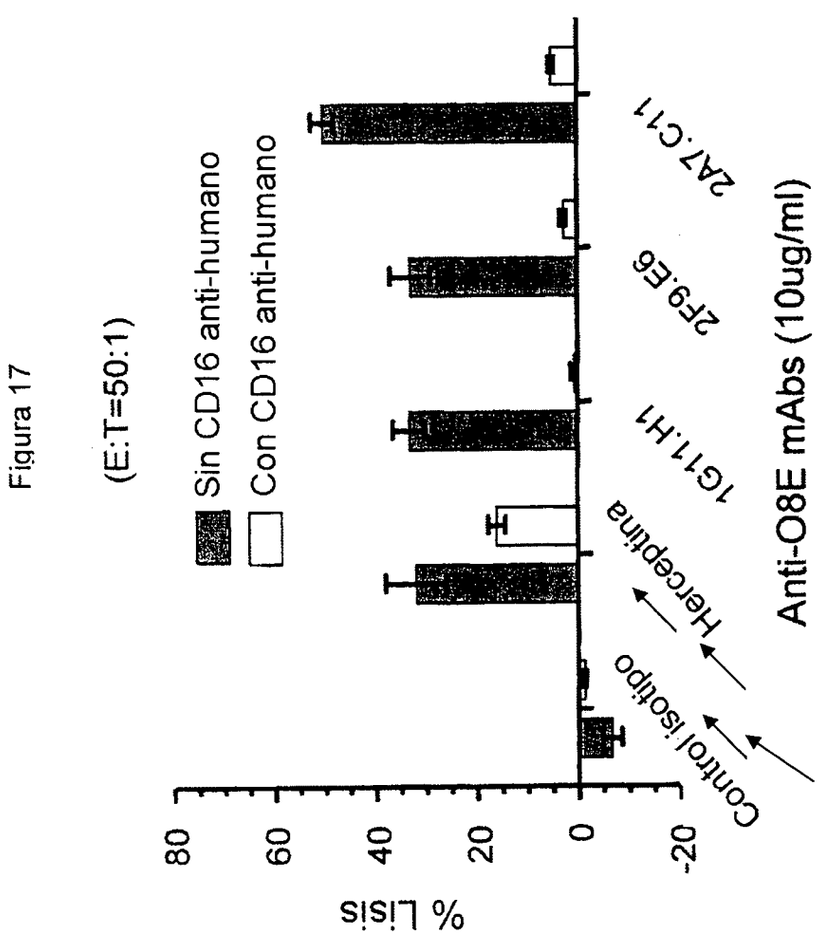

(E:T=50:1)
Sin CD16 anti-humano
Con CD16 anti-humano
% Lisis
80
60
40
20
0
-20
Control isotipo
Herceptina
1G11.H1
2F9.E6
2A7.C11
Anti-O8E mAbs (10ug/ml)

Figura 18

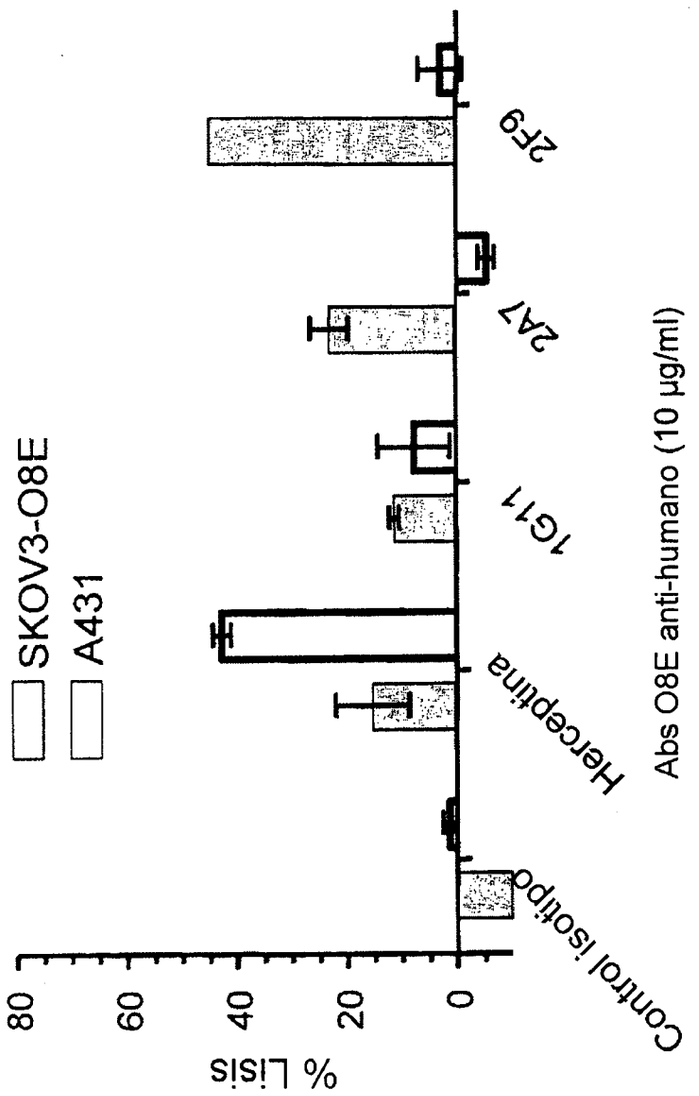
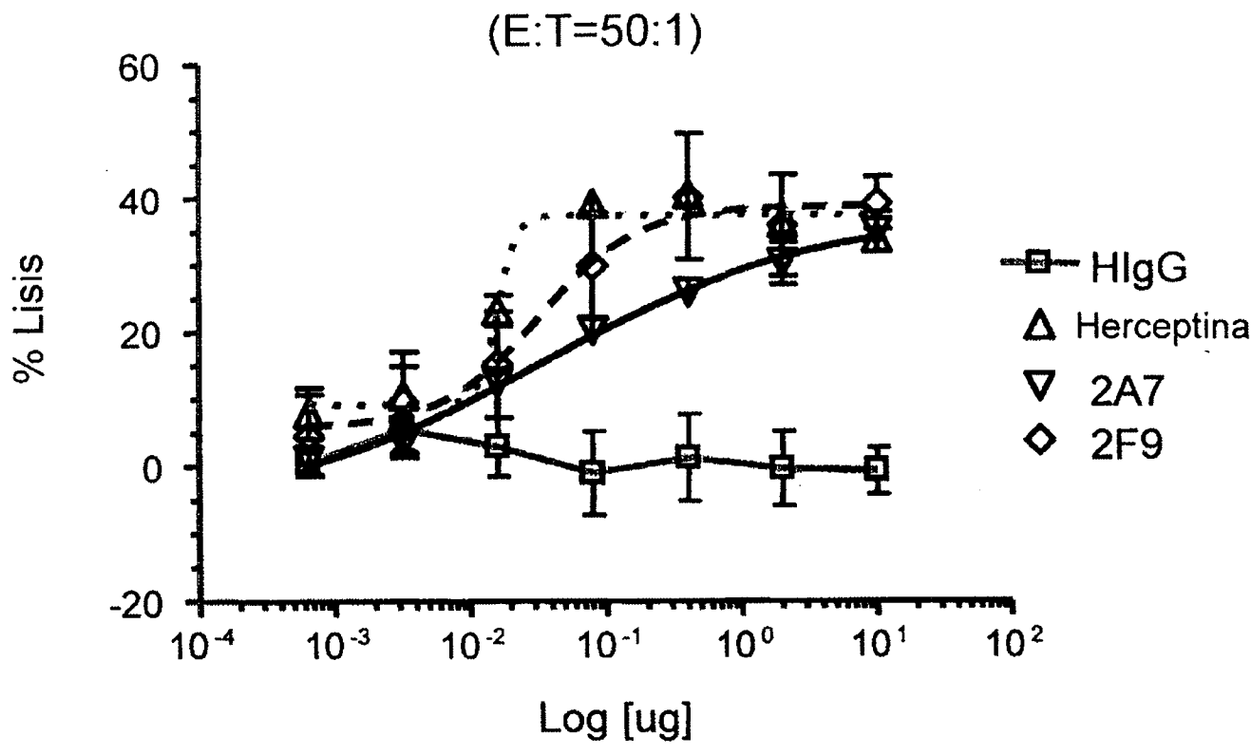

SKOV3-O8E
A431
% Lisis
80
60
40
20
0
Control isotipo
Herceptina
1G11
2A7
2F9
Abs O8E anti-humano (10 µg/ml)

Figura 19


(E:T=50:1)
% Lisis
60
40
20
0
-20
10^{-4}
10^{-3}
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
Log [ug]
HIgG
Herceptina
2A7
2F9

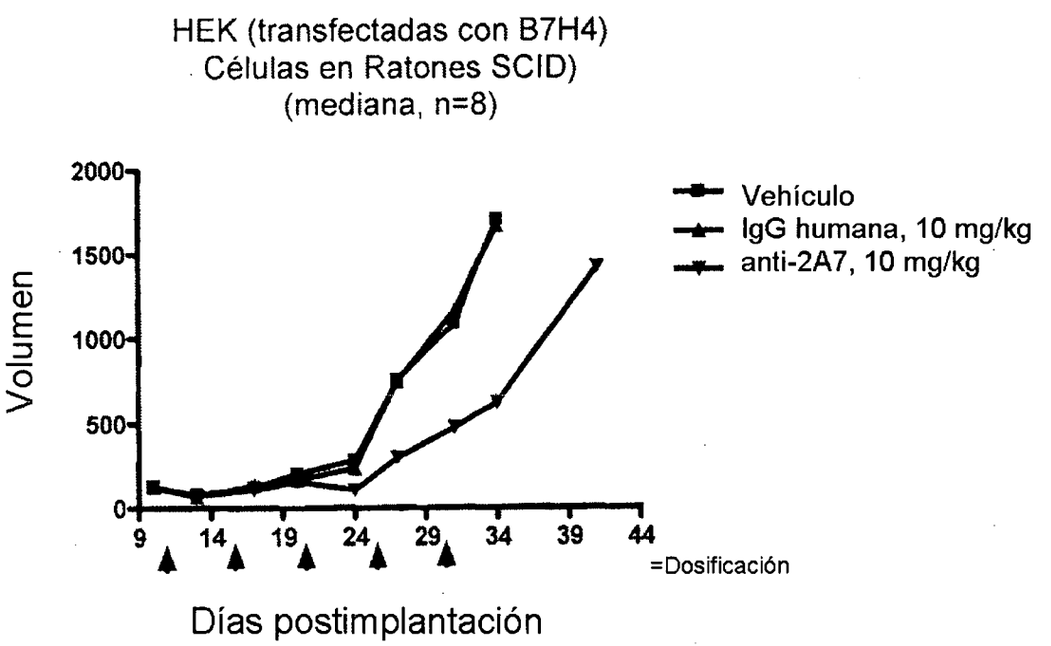

HEK (transfectadas con B7H4)
Células en Ratones SCID)
(mediana, n=8)
Volumen
2000
1500
1000
500
0
9
14
19
24
29
34
39
44
=Dosificación
Días postimplantación
Vehículo
IgG humana, 10 mg/kg
anti-2A7, 10 mg/kg

Figura 20

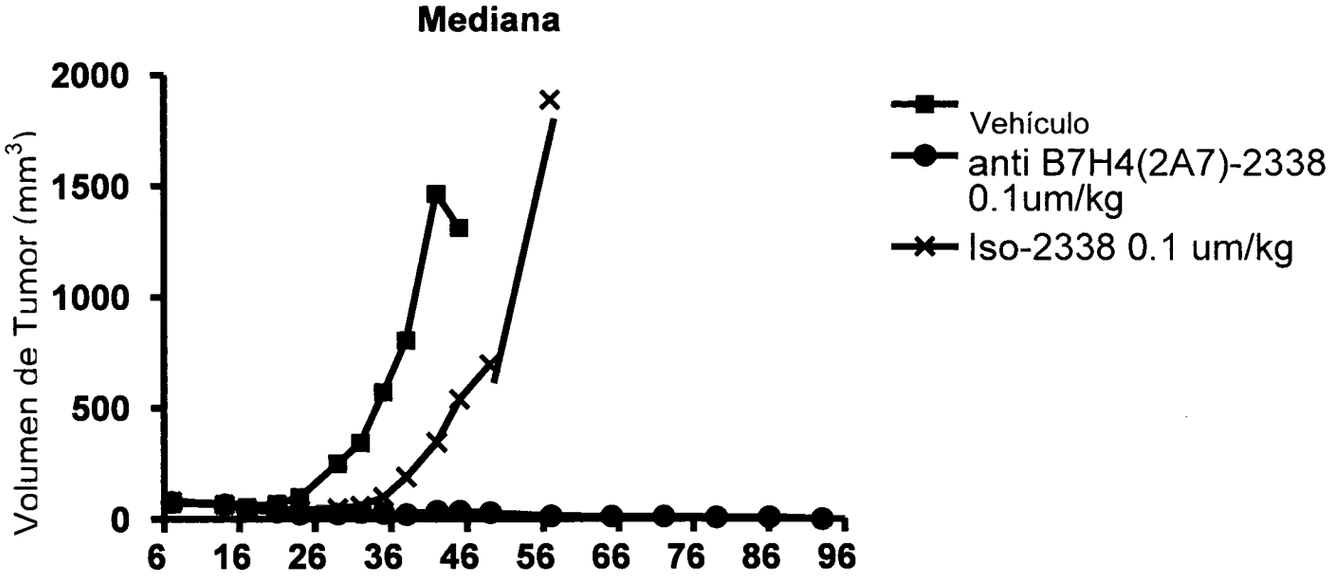

Mediana
2000
1500
1000
500
0
Volumen de Tumor (mm3)
6
16
26
36
46
56
66
76
86
96
Vehículo
anti B7H4(2A7)-2338 0.1um/kg
Iso-2338 0.1 um/kg
Días postimplantación

Figura 21

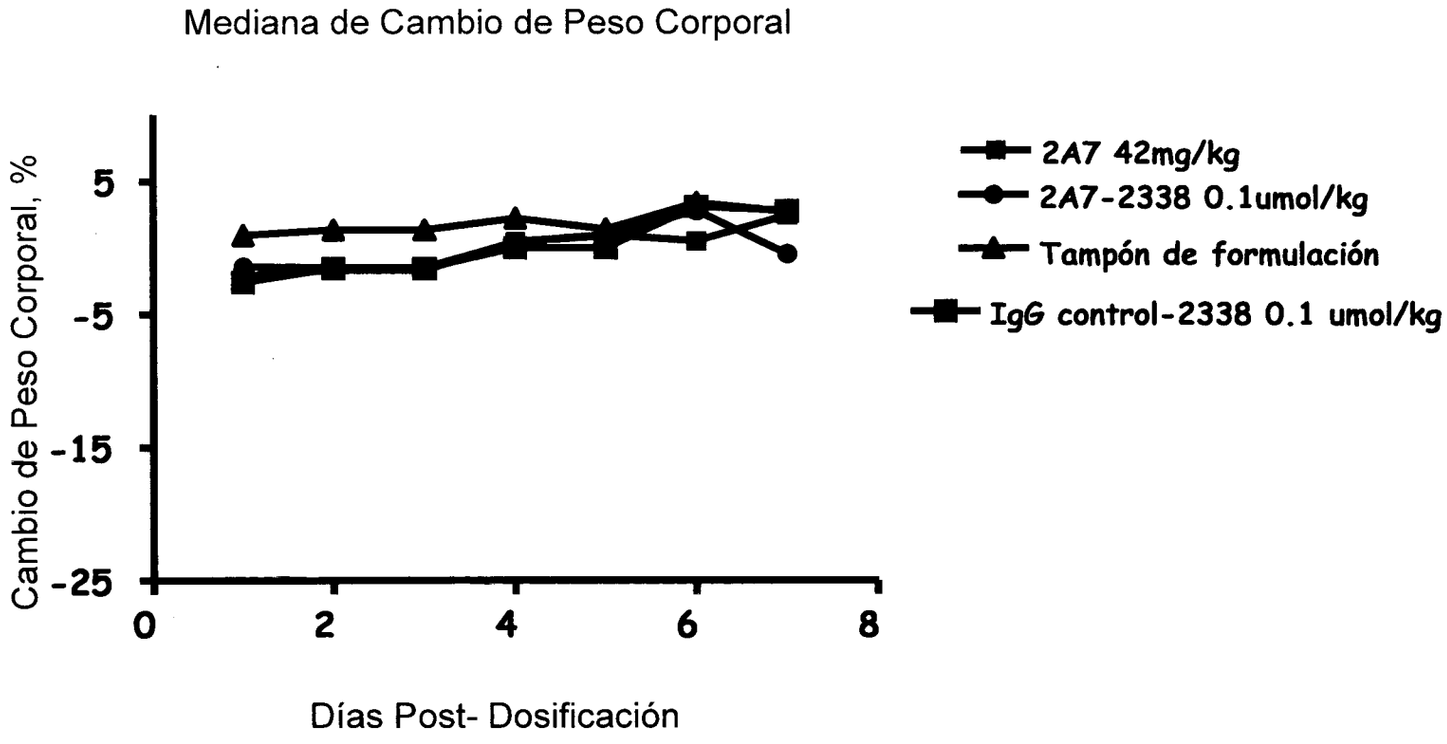

Mediana de Cambio de Peso Corporal
Cambio de Peso Corporal, %
5
-5
-15
-25
0
2
4
6
8
Días Post- Dosificación
2A7 42mg/kg
2A7-2338 0.1umol/kg
Tampón de formulación
IgG control-2338 0.1 umol/kg

Figura 22

AS 114.153.

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by **Paul Piperato**

3. acting in the capacity of **County Clerk**

4. bears the seal/stamp of the county of **Rockland**

Certified

5. At Albany, New York 6. the 11th day of June 2010

7. by Secretary of State, State of New York

8. No. A-95402F

9. Seal/Stamp 10. Signature

STATE OF NEW YORK ★ DEPARTMENT OF STATE ★ EXCELSIOR

Lorraine Cortés-Vázquez
Secretary of State

04135595.RSL (REV: 02/24/10)

077375.0903

VERIFICATION

STATE OF NEW YORK)
) ss:
COUNTY OF NEW YORK)

I verify that the attached document identified as:

Assignment

is a true copy of the document as executed by Jonathan A. Terrett on March 18, 2010, Josephine M. Cardarelli on March 19, 2010, Chetana Rao-Naik on March 5, 2010, Bingliang Chen on March 18, 2010, and David J. King on March 19, 2010 to **Bristol-Myers Squibb Company** in connection with International Application No. PCT/US08/084923 filed November 26, 2008.

Laurie Nieves

Subscribed and sworn to before me this 26th day of May 2010.

Patricia A. Simpson, Notary Public

PATRICIA A. SIMPSON
NOTARY PUBLIC, State of New York
No. 01SI6150975
Qualified in Rockland County
Commission Expires August 7, 2010

NY02:684911.1

Attorney Docket No. Medx-0199PC1

ASSIGNMENT

We,

TERRETT, Jonathan A.; CARDARELLI, Josephine M.; Rao-Naik, Chetana; CHEN, Bingliang; KING, David J.

pursuant to contractual obligations heretofore assumed by us and/or for good and valuable consideration, the receipt and adequacy of which is hereby acknowledged, do hereby sell and assign to **Bristol-Myers Squibb Company**, a Delaware corporation, having a place of business at Rt. 206 & Province Line Road, Princeton, NJ 08543-4000, its successors, assigns and legal representatives, all our right, title and interest, which includes the right to and full benefit of such priorities as may now or hereafter be granted to us by local laws or by treaty, including any international convention for the protection of industrial property, in and for all countries of the world, including the United States and its territories and possessions, in and to the invention entitled:

"ANTI-B7H4 MONOCLONAL ANTIBODY-DRUG CONJUGATE AND METHODS OF USE"

invented by us and described in International Patent Application **No. PCT/US2008/084923 filed November 26, 2008,**

including said International Patent Application and any application claiming priority from said International Patent Application, filed in any country, and any patents which may be issued and/or granted thereon, and all divisions, continuations, reissues, reexamination certificates and extensions thereof in all countries, the said interest being the entire ownership of said invention and all of said applications, patents (including reissue patents), extensions and reexamination certificates to be held and enjoyed by the said Bristol-Myers Squibb Company and its successors and assigns to the full end of the terms to which said patents (including reissue patents), extensions and reexamination certificates may be granted and/or issued, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by us if this sale, assignment and transfer had not been made;

and we hereby agree to communicate to said assignee or its representatives any facts known to us respecting said invention, to testify in any legal proceedings, to sign and/or execute any further documents and/or instruments which may be necessary, lawful and proper in and/or for the filing and/or prosecution of all applications, including divisional, continuation and reissue applications, extensions and reexamination certificates and/or the granting and/or issuance thereof and/or to otherwise secure title to said invention and all of said applications, patents (including reissue patents, extensions and reexamination certificates) in said assignee, and in general to do everything possible to aid said assignee, its successors and assigns to obtain and enforce proper protection for said invention in all countries.

Signature: _____

Jonathan A. Terrett

STATE OF **California**)
)
COUNTY OF **Santa Clara**)

On this 18th day of March, 2010, before me personally came **Jonathan A. Terrett**, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she executed the same in his/~~her/their~~ authorized capacity, and that by his/her signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal, this 18th day of March, 2010.

Signature: _____

Christopher R. Leach, Notary Public

CHRISTOPHER R. LEACH
COMM. #1666772
NOTARY PUBLIC - CALIFORNIA
SAN MATEO COUNTY
COMM. EXPIRES MAY 14, 2010

Signature: Josephine M. Cardarelli
Josephine M. Cardarelli

STATE OF **California**)
)
COUNTY OF **Santa Clara**)

On this 19th day of March, 2010, before me personally came **Josephine M. Cardarelli**, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she executed the same in his/her/their authorized capacity, and that by his/her signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal, this 19th day of March, 2010

Signature: Christy R. Leach
Christopher R. Leach, Notary Public

CHRISTOPHER R. LEACH
COMM. #1666772
NOTARY PUBLIC - CALIFORNIA
SAN MATEO COUNTY
COMM. EXPIRES MAY 14, 2010

Signature: Chetana Rao-Naik
Chetana Rao-Naik

STATE OF **California**)
)
COUNTY OF **Santa Clara**)

On this 5th day of May, 2010, before me personally came **Chetana Rao-Naik**, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she executed the same in his/her/their authorized capacity, and that by his/her signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal, this 5th day of May, 2010

CHRISTOPHER R. LEACH
COMM. #1666772
NOTARY PUBLIC - CALIFORNIA
SAN MATEO COUNTY
COMM. EXPIRES MAY 14, 2010

Signature: Christy R. Leach
Christopher R. Leach, Notary Public

Signature: _____
Bingliang Chen

STATE OF **California**)
)
COUNTY OF **Santa Clara**)

On this 18th day of March, 2010, before me personally came **Bingliang Chen**, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she executed the same in his/her/~~their~~ authorized capacity, and that by his/her signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal, this 18th day of March, 2010.

Signature: _____
Christopher R. Leach, Notary Public

CHRISTOPHER R. LEACH
COMM. #1666772
NOTARY PUBLIC - CALIFORNIA
SAN MATEO COUNTY
COMM. EXPIRES MAY 14, 2010

Signature: _____
David J. King

STATE OF **California**)
)
COUNTY OF)

On this _____ day of _____, 20___, before me personally came **David J. King**, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she executed the same in his/her/their authorized capacity, and that by his/her signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal, this _____ day of _____, 20___.

Signature: _____
, Notary Public

Signature: _____
Bingliang Chen

STATE OF **California**)
)
COUNTY OF **Santa Clara**)

On this _____ day of _____, 20___, before me personally came **Bingliang Chen**, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she executed the same in his/her/their authorized capacity, and that by his/her signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal, this _____ day of _____, 20___.

Signature: _____
Christopher R. Leach, Notary Public

Signature: David King
David J. King

STATE OF **California**)
)
COUNTY OF San Diego)

On this 19 day of March, 2010, before me personally came **David J. King**, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she executed the same in his/her/their authorized capacity, and that by his/her signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal, this 19 day of March, 2010.

Signature: _____, Notary Public

HOLLY J. KEIL
Commission # 1855606
Notary Public - California
San Diego County
My Comm. Expires Jul 23, 2013

TRADUCCIÓN AL ESPAÑOL del documento de cesión de solicitud de patente a **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**, firmado por los cedentes y el cesionario.

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. PAÍS: Estados Unidos de América

Este documento público

2. Ha sido firmado por: **Paul Piperato**

3. Actuando en capacidad de Secretario del Condado de **Rockland**

Certificado

5. En Abany, Nueva York
6. El día 11 de junio de 2010
7. Por el secretario del estado, Estado de Nueva York
8. No: A-95402F
9. Sello/Timbre
10. Firma

(FIRMA) .
Lorraine Cortés-Vázquez
Secretario del estado

Hay un Sello que Dice:

ESTADO DE NUEVA YORK
DEPARTAMENTO DE ESTADO

04135595.RSL (REV: 22/24/10)

DOCUMENTO ADJUNTO LLEVA RELIEVE

ESTADO DE NUEVA YORK
CONDADO DE ROCKLAND

Yo, Paul Piperato, Secretario del Condado y Secretario de la Corte Suprema del Estado Nueva York en y por el Condado de **Rockland**, la misma corte de registros que tiene por ley un sello, POR LA PRESENTE CERTIFICA QUE:

PATRICIA A. SIMPSON

de quien su nombre esta suscrito para certificar o probar el reconocimiento del instrumento anexo, en el momento de tomar este tipo de prueba de reconocimiento un NOTARIO PÚBLICO en el estado de Nueva York; debidamente comisionado, firmado y calificado para actuar así para el estado de Nueva York ; que con arreglo a una ley, comisión, o un certificado de su nombramiento y calificaciones, y su firma han sido registrados en mi oficina. Como tal NOTARIO PÚBLICO el/ella fue autorizado por las leyes de Nueva York para administrar juramentos y afirmaciones, recibir y certificar agradecimientos o pruebas de escrituras, hipotecas, poderes de abogados y cualquier instrumento escrito para tierras, viviendas y heredades que se deben leerse como evidencia o registradas en este estado, para protestar por las notas y para tomar y certificar declaraciones juradas, y que estoy muy familiarizado con la escritura de tal NOTARIO PÚBLICO, o tengo comparada la firma en del instrumento anexado con su firma depositada en mi oficina, y creo que esa firma es genuina EN FE DE LO CUAL; he puesto aquí mi mano y fijado mi sello oficial de la presente el 2 día de Junio de 2010.

[sello]

_____ (Firma)
Secretario del Condado y Secretario de la Corte Suprema del Condado de Rockland

077375.0903

VERIFICACIÓN

ESTADO DE NUEVA YORK)
) ss:
CONDADO DE NUEVA YORK)

Yo cerífico que el documento adjunto identificado como:

Cesión

Es una copia de el documento ejecutado por Jonathan A.TERRETT en Marzo 18, 2010, Josephine M. CARDARELLI en Marzo 19, 2010, Chetana RAO-NAIK en Marzo 5, 2010, Bingliang CHEN en Marzo 18, 2010, y David J. KING en Marzo 19, 2010 a **Bristol-Myers Squibb Company** en conexión con la Solicitud Internacional No. PCT/US08/084923 registrada el 26 de Noviembre de 2008.

(FIRMA)
Laurie Nieves

Suscrito y firmado ante mí este día 26 de mayo de 2010.

(FIRMA)
Patricia A. Simpson, Notario Público

Hay un Sello que Dice:

Patricia A. Simpson
NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE NUEVA YORK
No. 01SI6150975
Competente en el Condado de Rockland
Mi comisión vence Agosto 7, 2010.

N ° de expediente del abogado: Medx-0199PC1

CESIÓN

Nosotros,

Jonathan A.TERRETT, Josephine M. CARDARELLI, Chetana RAO-NAIK, Bingliang CHEN, David J. KING

cumplimiento de obligaciones contractuales asumidas hasta ahora por nosotros y/o para su consideración buena y valiosa, el recibo y suficiencia de los cuales son reconocidos aquí, se reconocen, por la presente venta y asignación a **Bristol-Myers Squibb Company**, una corporación de Delaware, teniendo un lugar de negocios en Rt. 206 & Province Line Rd. Princeton, NJ 08543-4000, sus sucesores, cedentes y representantes legales, todos nuestros derechos, títulos e intereses, lo que incluye el derecho a beneficiarse plenamente y de las prioridades que puedan ahora o en el futuro se nos ha concedido por las leyes locales o por tratado, incluyendo cualquier convenio internacional para la protección de la propiedad industrial, en y para todos los países en el mundo, incluyendo los Estados Unidos y sus territorios y posesiones, en y para la invención titulada:

"CONJUGADO ANTICUERPO MONOCLONAL ANTI-B7H4-FÁRMACO Y MÉTODOS DE UTILIZACIÓN"

Inventado por nosotros y descrito en la Solicitud Internacional de Patente No. PCT/US08/084923 registrada el 26 de Noviembre de 2008.

Incluida dicha Solicitud Internacional de Patente y cualquier solicitud reivindicando prioridad de dicha Solicitud Internacional de Patente, registrada en nuestro país, y cualquier patente la cual pueda ser expedidas y / o concedidas al respecto, y todas sus divisiones, continuaciones, re-expediciones, certificados de nuevos exámenes y extensiones, en todos los países, de dicho interés es la propiedad completa de dicha invención y todas estas peticiones, las patentes (incluidas las patentes re-expedidas), extensiones y los certificados de nuevos exámenes que la tenga y goce por el mencionado **Bristol-Myers Squibb Company** y sus sucesores y asignados hasta el final completo de los términos en que dichas patentes (incluidas las patentes re-expedidas), extensiones y los certificados de nuevos exámenes sean concedidos y/o emitidos, de la manera más completa y enteramente como el mismo se habría celebrado y disfrutado por nosotros si esta venta, cesión y transferencia no se hubiese hecho;

y nosotros aaceptamos aquí comunicar a dicho cesionario o sus representantes cualquier hecho conocido por nosotros respecto a dicha invención, para testificar en cualquier procedimiento legal, para firmar y/o ejecutar cualquier documento más allá y/o instrumentos lo cuál sea necesario, legalidad y regularidad, y / o para el llenado y / o el enjuiciamiento de todas las solicitudes, incluyendo solicitudes divisionales, continuaciones y nuevamente expedidas, extensiones y certificados y/o su emisión y / o proteja dicho título de la invención y todos sus solicitudes, patentes (incluidas las patentes re-expedidas, extensiones y los certificados de nuevos exámenes) que la tenga y goce por el mencionado por general para hacer todo lo posible para ayudar a ese cesionario, sus sucesores y cesionarios para obtener y hacer cumplir apropiadamente la protección de dicha invención en todos los países.

Firma: _____(firma)_____.
Jonathan A.TERRETT
Estado de California
Condado de California

Este día 18 de marzo de 2010, ante mí personalmente se presentó Jonathan A.TERRETT, quién probó antes mi en las bases de evidencia satisfactoria ser la persona quien su nombre es suscrito dentro de este instrumento y reconocióante mí que él/ella ejecutaron el mismo en su capacidad autorizada, y que por su firma en este intrumentola persona, o la entidad a nombre de la cual esta persona actuó, ejecuto este instrumento.

Yo certifico bajo PENA DE PERJURIO bajo las leyes del estado de California que el siguiente párrafo es copia verdadera y correcta.

TESTIGO de mi mano y sello oficial, este día 18 de marzo de 2010.

Firma _____(firma)_____
Christopher R. Leach, Notario Público

Hay un sello que dice:

Christopher R. Leach
COMM No. 1666772
NOTARIO PÚBLICO CALIFORNIA
CONDADO DE SAN MATEO
MI COMISIÓN VENCE 14 DE MAYO DE 2019

Firma: _____(firma)_____.
Josephine M. CARDARELLI
Estado de California
Condado de Santa Clara

Este día 19 de marzo de 2010, ante mí personalmente se presentó Jonathan A.TERRETT, quién probó antes mi en las bases de evidencia satisfactoria ser la persona quien su nombre es suscrito dentro de este instrumento y reconocióante mí que él/ella ejecutaron el mismo en su capacidad autorizada, y que por su firma en este intrumentola persona, o la entidad a nombre de la cual esta persona actuó, ejecuto este instrumento.

Yo certifico bajo PENA DE PERJURIO bajo las leyes del estado de California que el siguiente párrafo es copia verdadera y correcta.

TESTIGO de mi mano y sello oficial, este día 19 de marzo de 2010.

Firma _____(firma)_____
Christopher R. Leach, Notario Público

Hay un sello que dice:

Christopher R. Leach
COMM No. 1666772
NOTARIO PÚBLICO CALIFORNIA
CONDADO DE SAN MATEO
MI COMISIÓN VENCE 14 DE MAYO DE 2019

Firma: _____(firma)_____.
Chetana RAO-NAIK
Estado de California
Condado de Santa Clara

Este día 5 de mayo de 2010, ante mí personalmente se presentó Jonathan A.TERRETT, quién probó antes mi en las bases de evidencia satisfactoria ser la persona quien su nombre es suscrito dentro de este instrumento y reconocióante mí que él/ella ejecutaron el mismo en su capacidad autorizada, y que por su firma en este intrumentola persona, o la entidad a nombre de la cual esta persona actuó, ejecuto este instrumento.

Yo certifico bajo PENA DE PERJURIO bajo las leyes del estado de California que el siguiente párrafo es copia verdadera y correcta.

TESTIGO de mi mano y sello oficial, este día 5 de mayo de 2010.

Firma _____(firma)_____
Christopher R. Leach, Notario Público

Hay un sello que dice:

Christopher R. Leach
COMM No. 1666772
NOTARIO PÚBLICO CALIFORNIA
CONDADO DE SAN MATEO
MI COMISIÓN VENCE 14 DE MAYO DE 2019

Firma: _____(firma)_____.
Bingliang CHEN
Estado de California
Condado de Santa Clara

Este día 18 de marzo de 2010, ante mí personalmente se presentó Jonathan A.TERRETT, quién probó antes mi en las bases de evidencia satisfactoria ser la persona quien su nombre es suscrito dentro de este instrumento y reconocióante mí que él/ella ejecutaron el mismo en su capacidad autorizada, y que por su firma en este intrumentola persona, o la entidad a nombre de la cual esta persona actuó, ejecuto este instrumento.

Yo certifico bajo PENA DE PERJURIO bajo las leyes del estado de California que el siguiente párrafo es copia verdadera y correcta.

TESTIGO de mi mano y sello oficial, este día 18 de marzo de 2010.

Firma _____(firma)_____
Christopher R. Leach, Notario Público

Hay un sello que dice:

Christopher R. Leach
COMM No. 1666772
NOTARIO PÚBLICO CALIFORNIA
CONDADO DE SAN MATEO
MI COMISIÓN VENCE 14 DE MAYO DE 2019

Firma: _____.
David J. KING
Estado de California
Condado de _____

Este día ___ de _____ de 20___, ante mí personalmente se presentó Jonathan A.TERRETT, quién probó antes mi en las bases de evidencia satisfactoria ser la persona quien su nombre es suscrito dentro de este instrumento y reconocióante mí que él/ella ejecutaron el mismo en su capacidad autorizada, y que por su firma en este intrumentola persona, o la entidad a nombre de la cual esta persona actuó, ejecuto este instrumento.

Yo certifico bajo PENA DE PERJURIO bajo las leyes del estado de California que el siguiente párrafo es copia verdadera y correcta.

TESTIGO de mi mano y sello oficial, este día ___ de _____ de 20___.

Firma _____
, Notario Público

Firma: _____.
Bingliang CHEN
Estado de California
Condado de Santa Clara

Este día ___ de _____ de 20___, ante mí personalmente se presentó Jonathan A.TERRETT, quién probó antes mi en las bases de evidencia satisfactoria ser la persona quien su nombre es suscrito dentro de este instrumento y reconocióante mí que él/ella ejecutaron el mismo en su capacidad autorizada, y que por su firma en este intrumentola persona, o la entidad a nombre de la cual esta persona actuó, ejecuto este instrumento.

Yo certifico bajo PENA DE PERJURIO bajo las leyes del estado de California que el siguiente párrafo es copia verdadera y correcta.

TESTIGO de mi mano y sello oficial, este día ___ de _____ de 20___.

Firma _____
Christopher R. Leach, Notario Público

Firma: _____(firma)_____.
David J. KING
Estado de California
Condado de San Diego

Este día 19 de marzo de 2010, ante mí personalmente se presentó Jonathan A.TERRETT, quién probó antes mi en las bases de evidencia satisfactoria ser la persona quien su nombre es suscrito dentro de este instrumento y reconocióante mí que él/ella ejecutaron el mismo en su capacidad autorizada, y que por su firma en este intrumentola persona, o la entidad a nombre de la cual esta persona actuó, ejecuto este instrumento.

Yo certifico bajo PENA DE PERJURIO bajo las leyes del estado de California que el siguiente párrafo es copia verdadera y correcta.

TESTIGO de mi mano y sello oficial, este día 19 de marzo de 2010.

Firma _____(firma)_____
, Notario Público

Hay un sello que dice:

Holly J. Keil
Comisión No. 1855606
NOTARIO PÚBLICO CALIFORNIA
CONDADO DE SAN DIEGO
MI COMISIÓN VENCE 23 DE JULIO DE 2013

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA

2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MAURA O KNOBL

3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY

4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MAURA O KNOBL, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY

6. THE 13TH DAY OF JANUARY 2006

7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER

8. NO. A248886

9. SEAL/STAMP:

10. SIGNATURE:

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
30 JUN. 2010
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

Brigard & Castro

BOGOTA - COLOMBIA

PODER

Yo (nosotros)

domiciliado(s) en

Nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, de Bogotá, Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía, en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, registros de marcas, diseños industriales, modelos de utilidad, depósitos de nombres comerciales, lemas comerciales y enseñas, registros de derechos de autor y contratos sobre los mismos, obtención de certificados de obtentor de variedades vegetales, así como sus prórrogas, renovaciones, anotaciones de traspaso, cambios de nombre y/o domicilio; elaborar, tramitar y registrar contratos de licencia y licencias de cualesquiera clases; intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso ante cualquier juez, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía tales como: oposiciones al registro de marcas; acciones de caducidad, cancelación y nulidad; acciones reivindicatorias, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos y observaciones a solicitudes de patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, en el ejercicio de medidas cautelares y en otras acciones o medidas similares.

A este efecto, lo(s) faculto(amos) para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, nulidades, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores, dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros intereses), con todas las demás facultades legales necesarias.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, y la de sustituirlo en todo o en parte y revocar sustituciones. Asimismo nombro(amos) a: **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** y/o **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** y/o **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciliado(s) en la Carrera 7 No. 16-56 Piso 9, mis (nuestros) apoderados en Colombia, con facultades para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Otorgado y firmado en

hoy de de 200_

Firma

Nombre
Cargo

POWER OF ATTORNEY

I (We) BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

domiciled in Princeton, New Jersey, USA

Hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, of Bogotá, Colombia, my (our) true and lawful attorneys with special, ample and sufficient power to obtain from the Colombian administrative, judicial and police offices and authorities, in any instance, privileges of patents of invention, registration of trademarks, industrial designs and utility models; registration of commercial names, slogans and emblems, registration of copyright and contracts related thereto, certificates of obtainers of vegetables varieties, as well as extensions, renewals and recordal of assignments and changes of name and domicile related to the above; to prepare, prosecute and register licenses of any kind; to act as plaintiff or defendant in any instance or recourse, and before any judge, corporation, public official or authority in judicial, administrative and police actions, such as: oppositions to the registration of trademarks; caducity, cancellation and nullity actions; claim actions derived from the obtaining or exploitation of licenses, action of unfair competition; criminal proceedings, actions for payment of damages: claims or observations on patent applications, models, industrial designs and utility models; in the exercise of preventive measures and in other actions or similar proceedings.

To that effect they hereby empowered to file applications, formulate descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, nullities, appeals and claims; to pay taxes, quotas and assessments prescribed by law, renounce or waive the rights granted or in the process of granting; to receive all kinds of documents and valuables, giving the respective release of receipt, and, in general, to take before said authorities the necessary steps to such effect, and any measures that they may deem pertinent to the safeguard of my (our) interest(s), with all the other necessary legal powers.

This power includes the faculty to ratify or confirm desist, settle and compromise on my (our) behalf, and to substitute this power in whole or in part and to revoke substitutions. At the same time I (We) hereby appoints **JUAN PABLO CADENA SARMIENTO** and/or **CARLOS H. PALACIO EASTMAN** and/or **MARTIN E. TORRES CARDOZO**, domiciled in Carrera 7 No. 16-56, Piso 9, my (our) attorney(s) in fact, with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys.

Granted and signed in

this 11th day January of

200_

Signature

Name Suzanne E. Babajko
Title Senior Patent Counsel

El Notario Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.

30 JUN. 2010

NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Hoy de de
personalmente compareció ante mí

a quien conozco, y de quien me consta que firmó el anterior documento, debidamente juramentado declaró y dijo que él (ella) es

de

Sociedad legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado; 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 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 objeto social de la sociedad.

El suscrito Notario hace constar que tuvo a la vista las pruebas de la existencia de la sociedad.

Estado de
con fecha

y que quien confiere el presente poder es su representante.

Notario Público (sello)

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

On this 11 day of January of 2006 personally appeared before me SUZANNE E. BABAJKO

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 (she) is the
SENIOR PATENT COUNSEL

of BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

Which is legally constituted for a term not yet expired, that 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 purpose of company.

The undersigned Notary Public attests that he has seen the documents that prove the existence of the company.

State of
under date of

and that he (she) who grants the present power of attorney is its Representative.

Public Notary (Seal)

CERTIFICADO NOTARIAL PERSONA NATURAL

Hoy de de , compareció(eron) ante mí

a quien (es) conozco y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede y quien(es) declara(n) que otorgan el mismo para los fines y propósitos que en él se expresan.

Notario Público (sello)

LEGALIZACION POR APOSTILLA ES REQUERIDA.

NOTARIAL CERTIFICATE NATURAL PERSON

On this 11th day of January of 2006
personally appeared before me
Suzanne E. Babajko
who is(are) known to me and whom I attest executed the foregoing document and he (they) declared he (they) grant(s) the document for the uses and purposes therein expressed.

Maura O. Knobl
Notary Public
MAURA O. KNOBL
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires July 25, 2008

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se retiró la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
30 JUN. 2010
NOTARIO CUARENTA
Bogotá D.C., Colombia
Agustín Castillo Zárate

LEGALIZATION BY APOSTILLE IS REQUIRED.

TRADUCCION AL ESPAÑOL del Documento de Poder otorgado por **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** domiciliada en **Princeton, New Jersey, Estados Unidos de América.**

APOSTILLA
(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

2. ESTE DOCUMENTO PUBLICO HA SIDO FIRMADO POR:
MAURA O KNOBL

3. ACTUANDO EN CAPACIDAD DE:
NOTARIO PUBLICO DE NEW JERSEY

4. LLEVA EL SELLO/TIMBRE DE:
MAURA O KNOBL, NOTARIO

CERTIFICADO

5. EN TRENTON, NEW JERSEY

6. EL 13 DE ENERO DE 2006

7. POR: John E. McCormac, CPA, TESORERO DE NEW JERSEY

8. NO. A248886

9. SELLO/TIMBRE:

10. FIRMA

(Firma)

En la Notaría Cuarenta de este Círculo se cotejó la presente fotocopia que coincide con el original que se ha tenido a la vista.
30 JUN. 2010
NOTARIO CUARENTA
Bogotá, D.C. Colombia
Agustín Castillo Zárate

114.153

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-079501- -00000-0000
Fecha: 2010-06-30 17:59:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 388

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita 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 ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Folio 390

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO
Apoderado(a) y/o Representante de
BRISTOL - MYERS SQUIBB COMPANY

REFERENCIA	Radicación No.	10 79501
	Solicitud internacional	PCT/US2008/084923
	Fecha inicio fase nacional	30/06/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	10836
	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, 13 JUL. 2010

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

adpa11