Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. EXPEDIENTE No. 07-23991

54. TITULO: " ANTICUERPOS ANTI-5T4 HUMANIZADOS Y CONJUGADOS DE ANTICUERPOS ANTI-5T4/CALIQUEAMICINA"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL: A61K 47/48; C07K 16/30

71. SOLICITANTE: WYETH

DOMICILIO: NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS

F.J. 10-04-2007
Poder, Cert.

74. APODERADO: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
T.P.No.20.281

22. BOGOTA, D.C., MARZO 09, 2007

BOGYND-DMB-837280-v1-DOC

PETITORIO

nnn91

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-023891- -00000-0000
Fec: 2007-03-09 16:36:31 Usp. 2020 NUEVENAJONES
Fra. 11 PATENTES
Eve: 378 FASE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios 454

icación

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

(1) SOLICITUD DE :

[X]	Patente de Invención	[ ]	Patente de Modelo de Utilidad
[X]	Capítulo I.	[ ]	Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)

Nombre: WYETH

Dirección: Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940, Estados Unidos

Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos
Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos

Teléfono: Fax:
E-Mail

IDENTIFICACION
C.C. [ ] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual _____
Número _____

(3) REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-82 Piso 6

Teléfono: 634 1500 Fax: 376 2211
E-Mail: offica.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION
C.C. [X] NIT [ ]
C.E. [ ] Otro [ ]
Cual _____
Número 79.143.366 de Usaquén TP 20.281

(4) INVENTOR (ES) (72)

Nombre: BOGHAERT, Erwin, R; DAMLE, Nitin, K; GILL, Davinder, S; MARQUETTE, Kimberly, A.; TCHISTIAKOVA, Lioudmila; HAMANN, Philip, Ross y KUNZ, Art

Dirección: 93 Ludlam Road, Monroe, NY 10950, Estados Unidos; 53 Stevenson Lane, Upper Saddle River, NJ 07458, Estados Unidos; 208 Fox Hill Road, Burlington, MA 01803, Estados Unidos; 66 Springfield Street, Apt. #1, Somerville, MA 02143, Estados Unidos; 19 Abbot Bridge Drive, Andover, MA 01810, Estados Unidos; 9 Jacobs Road, Thiells, NY 10984, Estados Unidos; 11 Jennifer Drive, New City, NY 10956, Estados Unidos, respectivamente.

Nacionalidad o Domicilio: Belga, Estadounidense, Estadounidense, Estadounidense, Canadiense, Estadounidense y Estadounidense.

(5) PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/032196 Fecha 09-SEP-05
Publicación Internacional No. WO 2006/031653 Fecha 23-MAR-06

(6) Título (54) ANTICUERPOS ANTI-5T4 HUMANIZADOS Y CONJUGADOS DE ANTICUERPOS ANTI-5T4/CALIQUEAMICINA

(7) Clasificación Internacional (51) A61K 47/48; C07K 16/30; C07K 16/46; A61K 39/395; A61P 35/00.

(8) Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI [X] NO [ ]	US	10-SEP-04	60/608,494

(9) Comprobante de pago No. 06-85246, 06-85247, 07-6703 y 07-2708 **Fecha** 3-nov-6, 3-nov-6, 30-ene-7 y 12-ene-7

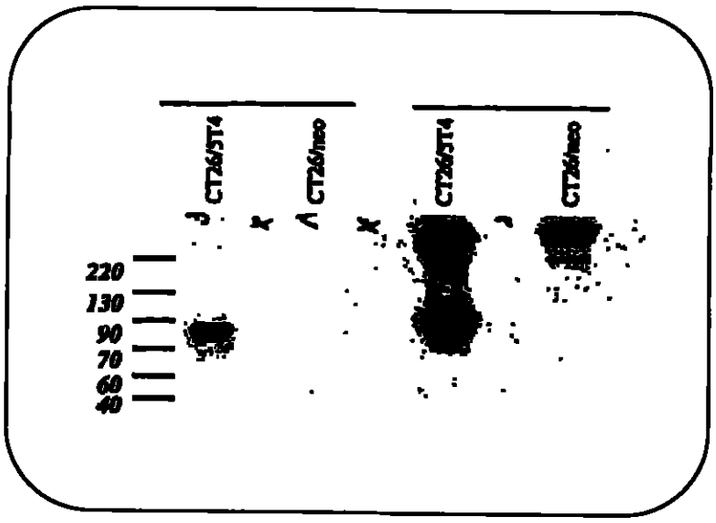
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(10) **ANEXOS**

00002

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [ ] Poderes, si fuere el caso
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [X] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [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 del 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 12 x 12
- [ ] 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: Extractos, Reporte INternacional de Búsqueda y Opinión escrita traducidos, Notificación y traducción de cambio y notificación presentación prioridad.

(11) **FIGURA CARATERISTICA**



(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 T.P. 20.281

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

CL 025

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 860176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-023891--00000-0000
Fec: 2007-03-09 16:36:31 Usu: 2020 NUEVOS RADICADOS
Cra: 11 PATENTES
Eve: 378 PASEN AJUNAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 454

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 85,246
FECHA : NOVIEMBRE 3 DE 2006

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

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ORLANDO LINARES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54663178	03/11/2006	126,285,000.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-06 REGISTRO DE CESION, CAMBIO NOM	13 NOMBRES Y ENSEÑAS COMERCIALES,MAR		234,000.00
		TOTAL :	$	234,000.00

SON: DOSCIENTOS TREINTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

FIO 025

0000/4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 65,247
FECHA : NOVIEMBRE 3 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-023891- -00000-0000
Fec: 2007-03-09 10:36:31 Dep: 20 NUEVOS NEGOCIOS
Tra: 11 PATENTES
Eve: 378 PRIMERA NACIONAL
ACTO: 411 PRESENTACION FOLIOS: 002

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

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ORLANDO LINARES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54663178	03/11/2006	126,285,000.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-06 REGISTRO DE CESION, CAMBIO NOM	13 NOMBRES Y ENSEÑAS COMERCIALES,NAR	234,000.00
		TOTAL : $	234,000.

SON: DOSCIENTOS TREINTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

00005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-023891- -00000-0000
Fec: 2007-03-01 16:36:31 Usp: ZAU NUEVACREACIONES
Ins: 11 PATENTE
Cve: 3/N PASENACIONAL
Act: 411 PRESENTACION Folios: 454

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 8,703
FECHA : ENERO 30 DE 2007

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

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAG	Vr. PAGO
ORLANDO LINARES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	64180719	30/01/2007	58,635,000.00

C O N C E P T O

CT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	21 CERTIFICACIONES		11,000.00
			TOTAL : $	11,000.00

SON: ONCE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

L-008

b

0003

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-023991--00000-0000
Fec: 2007-05-04 10:36:31 Dep: 2020 NUEVAS RELACIONES
Tra: 11 PATENTES
Eve: 370 NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 454

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 7 - 2,708
FECHA : ENERO 12 DE 2007

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

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ORLANDO LINARES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	64321256	11/01/2007	71,059,000.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998	VALOR COMPLEMENTO TARIFA ANO ANTR	3,000.00
			TOTAL : $	3,000.00

SON: TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL ASUNTO No.

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2006/031653
PCT/US2005/032196

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To:

CAWLEY, Thomas, A., Jr.
Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP
P.O. Box 10500
McLean, VA 22102
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 23 March 2006 (23.03.2006)	
Applicant's or agent's file reference 40000/317753	IMPORTANT NOTICE

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2005/032196	09 September 2005 (09.09.2005)	10 September 2004 (10.09.2004)

Applicant
WYETH et al

The International Bureau transmits herewith the following documents:

☑ copy of the international application as published by the International Bureau on 23 March 2006 (23.03.2006) under No. WO 2006/031653

☐ copy of international application as republished by the International Bureau on under No. WO
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (*as the case may be*) on the front page of the attached document.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Philippe Becamel

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
23 March 2006 (23.03.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/031653 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 47/48 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/032196

(22) International Filing Date:
9 September 2005 (09.09.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/608,494 10 September 2004 (10.09.2004) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: WYETH [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: BOGHAERT, Erwin, R. [BE/US]; 93 Ludlam Road, Monroe, NY 10950 (US). DAMLE, Nitin, K. [US/US]; 53 Stevenson Lane, Upper Saddle River, NJ 07458 (US). GILL, Davinder, S. [US/US]; 208 Fox Hill Road, Burlington, MA 01803 (US). MARQUETTE, Kimberly, A. [US/US]; 66 Springfield Street, Apt. #1, Somerville, MA 02143 (US). TCHISTIAKOVA, Lioudmila [CA/US]; 19 Abbot Bridge Drive, Andover, MA 01810 (US). WIDOM, Angela, M. [US/US]; 19 Cherokee Road, Acton, MA 01720 (US). HAMANN, Philip, Ross [US/US]; 9 Jacobs Road, Thiells, NY 10984 (US). KUNZ, Art [US/US]; 11 Jennifer Drive, New City, NY 10956 (US).

(74) Agents: CAWLEY, Thomas, A., Jr. et al.; Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP, P.O. Box 10500, McLean, VA 22102 (US).

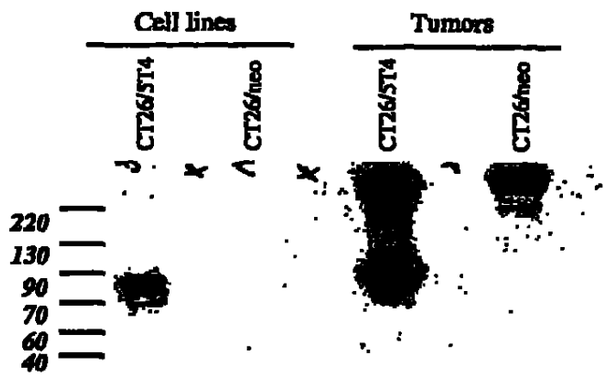
(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK,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

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: HUMANIZED ANTI-5T4 ANTIBODIES AND ANTI-5T4 ANTIBODY / CALICHEAMICIN CONJUGATES



(57) Abstract: Chimeric and humanized anti-5T4 antibodies and antibody/drug conjugates and methods for preparing and using the same.

WO 2006/031653 A2

HUMANIZED ANTI-5T4 ANTIBODIES AND ANTI-5T4 ANTIBODY / CALICHEAMICIN CONJUGATES

RELATED APPLICATIONS

Priority is claimed to U.S. Provisional Patent Application No. 60/608,494, filed on September 10, 2004, and incorporated by reference in its entirety herein.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention generally relates to humanized antibodies and antibody/drug conjugates (*i.e.*, immunoconjugates) for the treatment of malignant disorders. More particularly, the present invention relates to humanized anti-5T4 antibodies, isolated variable region nucleic acids and polypeptides for preparing the antibodies, and anti-5T4/cytotoxin conjugates, particularly, anti-5T4/calicheamicin conjugates.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Drug conjugates developed for systemic pharmacotherapy are target-specific therapeutic agents. The concept involves coupling a therapeutic agent to a carrier molecule with binding specificity for a defined target cell population. The availability of high affinity monoclonal antibodies has fostered the development of immunotherapies, *i.e.*, antibody-targeted drugs. Therapeutic agents that have been conjugated to monoclonal antibodies include cytotoxins, biological response modifiers, enzymes (*e.g.*, ribonucleases), apoptosis-inducing proteins and peptides, and radioisotopes. Antibody/cytotoxin conjugates are frequently termed immunocytotoxins, whereas antibody/drug conjugates consisting of antibodies and low-molecular-weight drugs such as methothrexate and adriamycin are called chemoantibody/drug conjugates. Immunomodulators contain biological response modifiers that are known to have regulatory functions such as lymphokines, growth factors, and complement-activating cobra venom factor (CVF). Radioantibody/drug conjugates consist of radioactive isotopes, which may be used as therapeutics to kill cells by their radiation or used for imaging. Antibody-mediated drug delivery to tumor cells augments tumor-killing efficacy of the drug by minimizing its uptake in normal tissues. *See e.g.*, Reff et al. (2002) *Cancer Control* 9:152-66; Sievers (2000) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46 Suppl:S18-22; Goldenberg (2001) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 39:195-201. MYLOTARG® (gemtuzumab ozogamicin) is a commercially available antibody/drug conjugate that works according to this principle and which is approved for the treatment of acute myeloid leukemia in elderly patients. *See* Sievers et al. (1999) *Blood* 93: 3678-84. In this case, the targeting molecule is an anti-CD33 monoclonal antibody that is conjugated to calicheamicin.

Immunotherapy in humans has been limited, in part due to adverse responses to non-human monoclonal antibodies. Early clinical trials using rodent antibodies revealed human anti-mouse antibody (HAMA) and human anti-rat antibody (HARA) responses, which lead to rapid clearance of the antibody. Less immunogenic antibodies have since been developed, including chimeric antibodies, humanized antibodies, PRIMATIZED® antibodies, and human antibodies prepared using transgenic mice or phage display libraries. *See* Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-5; Queen et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-33; Newman et al. (1992) *Biotechnology (NY)* 10:1455-60; Green et al. (1994) *Nat. Genet.* 7:13-21; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-97. Avoidance of a HAMA response permits high dose and repeated dose administration to achieve a therapeutic response.

Chimeric antibodies are prepared using recombinant cloning techniques to include variable regions, which contain the antigen-binding sites, from a non-human species antibody (*i.e.*, a species immunized with the antigen) and constant regions from a human immunoglobulin. Humanized antibodies are a type of chimeric antibody, wherein only those residues of the variable regions that are responsible for antigen binding are derived from a non-human species, while the remaining variable region residues as well as the constant regions are human. Humanized antibodies are even less immunogenic than traditional chimeric antibodies and show improved stability following administration to humans. *See* Benincosa et al. (2000) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292:810-6; Kalofonos et al. (1994) *Eur. J. Cancer* 30A:1642-50; Subramanian et al. (1998) *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17:110-5.

Candidate antibodies for drug targeting include antibodies that recognize oncofetal antigens, *i.e.*, antigens present on fetal cells and neoplastic cells, and which are largely absent from normal adult cells. *See e.g.*, Magdelenat (1992) *J. Immunol. Methods* 150: 133-43. The 5T4 oncofetal antigen is a 72 kDa highly glycosylated transmembrane glycoprotein comprising a 42 kDa non-glycosylated core (Hole et al. (1988) *Br. J. Cancer* 57: 239-46, Hole et al. (1990) *Int. J. Cancer* 45: 179-84; PCT International Publication No. WO89/07947; U.S. Patent No. 5,869,053). 5T4 includes an extracellular domain characterized by two leucine-rich repeats (LRRs) and an intervening hydrophilic region, which is an accessible antigen for targeted therapy (Myers et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9319-24).

Human 5T4 is expressed in numerous cancer types, including carcinomas of the bladder, breast, cervix, endometrium, lung, esophagus, ovary, pancreas, stomach, and testes, and is substantially absent from normal tissues, except for syncytiotrophoblast in placenta (*see, e.g.*, Southall et al. (1990) *Br. J. Cancer* 61: 89-95 (immunohistological distribution of 5T4 antigen in normal and malignant tissues); Mieke et al. (1997) *Clin. Cancer Res.* 3: 1923-1930 (low intercellular adhesion molecule 1 and high 5T4 expression on tumor cells correlate with reduced disease-free survival in colorectal carcinoma patients);

Starzynska et al. (1994) *Br. J. Cancer* 69: 899-902 (prognostic significance of 5T4 oncofetal antigen expression in colorectal carcinoma); Starzynska et al. (1992) *Br. J. Cancer* 66: 867-869 (expression of 5T4 antigen in colorectal and gastric carcinoma); Jones et al. (1990) *Br. J. Cancer* 61: 96-100 (expression of 5T4 antigen in cervical cancer); Connor and Stern (199) *Int. J. Cancer* 46: 1029-1034 (loss of MHC class-I expression in cervical carcinomas); Ali et al. (2001) *Oral Oncology* 37: 57-64 (pattern of expression of the 5T4 oncofoetal antigen on normal, dysplastic and malignant oral mucosa); PCT International Publication No. WO89/07947; U.S. Patent No. 5,869,053). For example, tissues reported to have no expression of 5T4 include the liver, skin, spleen, thymus, central nervous system (CNS), adrenal gland, and ovary. Tissues reported to have focal or low expression of 5T4 include the liver, skin, spleen, lymph node, tonsil, thyroid, prostate, and seminal vesicles. Weak-moderate diffuse expression of 5T4 has been reported in the kidney, lung, pancreas, pharynx, and gastro-intestinal tract. The only tissue reported to have high expression of 5T4 is syncytiotrophoblast; 5T4 was also absent from normal serum or the serum of pregnant women (i.e., levels < 10 ng/ml). Overexpression of 5T4 in tumors has been correlated with disease progression, and assessment of 5T4 expression has been suggested as a useful approach for identifying patients with short-term prognosis (Mulder et al. (1997) *Clin. Cancer Res.* 3: 1923-30, Naganuma et al. (2002) *Anticancer Res.* 22: 1033-8, Starzynska et al. (1994) *Br. J. Cancer* 69: 899-902, Starzynska et al. (1998) *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 10: 479-84, Wrigley et al. (1995) *Int. J. Gynecol. Cancer* 5: 269-274).

Several non-human anti-5T4 antibodies have been described, including mAb5T4, also called the H8 antibody, which recognizes a conformational epitope of the 5T4 antigen (Shaw et al. (2002) *Biochem. J.* 363: 137-45, PCT International Publication No. WO98/55607), a rat monoclonal antibody (Woods et al. (2002) *Biochem. J.* 366: 353-65), and the 5T4 mouse monoclonal antibody (U.S. Patent No. 5,869,053). Single chain anti-5T4 antibodies have also been described, as well as fusion proteins that include anti-5T4 antibody sequences fused to a therapeutic molecule. For example, anti-5T4 antibody sequences fused to the human IgG1 constant domain or the extracellular domain of murine B7.1 induces cytolysis of 5T4-expressing tumor cell lines (Myers et al. (2002) *Cancer Gene Ther.* 9: 884-96, Shaw et al. (2000) *Biochim. Biophys. Acta.* 1524: 238-46; U.S. Patent Application Publication No. 2003/0018004). Similarly, a single chain anti-5T4 antibody fused to a superantigen may stimulate T cell-dependent cytolysis of non-small cell lung carcinoma cells *in vitro* (Forsberg et al. (2001) *Br. J. Cancer* 85: 129-36). A phase I clinical trial using PNU-214936, a murine Fab fragment of the monoclonal antibody 5T4 fused to a mutated superantigen staphylococcal enterocytotoxin A (SEA), showed limited cytotoxicity and some anti-tumor response (Cheng et al. (2004) *J. Clin. Oncol.* 22(4):602-609). As an alternate therapeutic approach, recombinant 5T4 vaccines are suggested for the treatment of cancers

(Mulryan et al. (2002) *Mol. Cancer Ther.* 1: 1129-37; UK Patent Application Publication Nos. 2,370,571 and 2,378,704; EP Patent Application Publication Nos. EP 1,160,323 and 1,152,060).

Notwithstanding substantial interest in 5T4 as a potential target for immunotherapy, therapies that employ an anti-5T4 antibody conjugated to a therapeutic agent have not been described. The present invention provides humanized anti-5T4 antibodies and antibody/drug conjugates, as well as methods for producing the disclosed antibodies and antibody/drug conjugates and methods for their therapeutic use(s).

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides chimeric and humanized anti-5T4 antibodies and antibody fragments, and methods for preparing and using the same. The anti-5T4 antibodies of the invention comprise at least one light chain or at least one heavy chain, or fragments thereof, wherein the chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment (a) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity of at least about 1 x 10^{-7} M to about 1 x 10^{-12} M; (b) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity greater than 1 x 10^{-11} M; (c) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity greater than 5 x 10^{-11} M; (d) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity greater than a binding affinity of murine H8 anti-5T4 antibody binding to human 5T4 antigen; (e) specifically targets 5T4-expressing cells *in vivo*; (f) competes for binding to human 5T4 antigen with an antibody of any one of (a)-(e); (g) specifically binds to an epitope bound by any one of (a)-(e); or (h) comprises an antigen binding domain of any one of (a)-(e). Chimeric and humanized anti-5T4 antibodies of the invention comprise constant regions that are derived from human constant regions, such as IgG1 or IgG4 constant regions. For example, the human IgG1 heavy chain constant region can comprise an amino acid sequence of any one of SEQ ID NOs:25 or 85-89. As another example, the human IgG4 heavy chain constant region can comprise proline at position 241.

Representative chimeric anti-5T4 antibodies of the invention include antibodies comprising (a) a light chain variable region sequence comprising amino acids 1-107 of SEQ ID NO:1, (b) heavy chain variable region sequence comprises amino acids 1-120 of SEQ ID NO:2, or (c) a light chain comprising a variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:1, and a heavy chain comprises a variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:2. Additional representative chimeric anti-5T4 antibodies include antibodies comprising (a) a light chain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, and a heavy chain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:2; or (b) a light chain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:3, and a heavy chain comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:4.

PCT/US05/32196

Representative humanized anti-5T4 antibodies of the invention include antibodies comprising (a) framework regions comprising residues of a human antibody framework region; and (b) one or more CDRs of the light chain variable region of SEQ ID NO:17 or one or more CDRs of the heavy chain variable region of SEQ ID NO:18. For example, residues of a human antibody framework region can comprise (a) a human antibody light chain framework region of a DPK24 subgroup IV germ line clone, a VκIII subgroup, or a Vκ subgroup germ line clone; (b) a human antibody heavy chain framework region selected from the group consisting of DP-75, DP-8(VH1-2), DP-25, VI-2b and VI-3 (VH1-03), DP-15 and V1-8 (VH1-08), DP-14 and V1-18 (VH1-18), DP-5 and V1-24P (VH1-24), DP-4 (VH1-45), DP-7 (VH1-46), DP-10, DA-6 and YAC-7 (VH1-69), DP-88 (VH1-e), DP-3 and DA-8 (VH1-f); (c) a consensus sequence of a heavy chain framework region of (b); or (d) a framework region that is at least 95% identical to a framework region of (a)-(c).

Representative humanized anti-5T4 antibodies of the invention can also include two or more CDRs of SEQ ID NOs:17 or 18, such as two or all three CDRs of the light chain variable region of SEQ ID NO:17, or two or all three CDRs of the heavy chain variable region of SEQ ID NO:18, or one or more CDRs or the light chain variable region of SEQ ID NO:17 and one or more CDRs of the heavy chain variable region of SEQ ID NO:18, or all of the CDRs or SEQ ID NOs:17 and 18.

Representative humanized anti-5T4 antibodies of the invention can also comprise a light chain variable region comprising (a) an amino acid sequence of SEQ ID NO:17 or 23; (b) an amino acid sequence that is at least 78% identical to SEQ ID NO:17; or (c) an amino acid sequence that is at least 81% identical to SEQ ID NO:23. Similarly, humanized anti-5T4 antibodies of the invention can comprise a light chain variable region sequence encoded by a nucleic acid comprising: (a) a nucleotide sequence of SEQ ID NO:22 or 81; (b) a nucleotide sequence that is at least 90% identical to the nucleic acid of SEQ ID NO:22; (c) a nucleotide sequence that is at least 91% identical to the nucleic acid of SEQ ID NO:81; or (d) a nucleic acid that specifically hybridizes to the complement of SEQ ID NO:22 or SEQ ID NO:81 under stringent hybridization conditions.

Representative humanized anti-5T4 antibodies of the invention can also comprise a heavy chain variable region comprising (a) an amino acid sequence set forth as any one of SEQ ID NOs:18, 19, and 21; (b) an amino acid sequence that is at least 83% identical to SEQ ID NO:18; (c) an amino acid sequence that is at least 81% identical to SEQ ID NO:19; or (d) an amino acid sequence that is at least 86% identical to SEQ ID NO:21. Similarly, humanized antibodies of the invention can comprise a heavy chain variable region sequence encoded by a nucleic acid comprising (a) a nucleotide sequence of SEQ ID NO:20, 82, or 83; (b) a nucleotide sequence that is at least 91% identical to the nucleic acid of SEQ ID NO:20 or SEQ ID NO:83; (c) a nucleotide sequence that is at least 94% identical to the

nucleic acid of SEQ ID NO:82; or (d) a nucleic acid that specifically hybridizes to the complement of any one of SEQ ID NOs:20, 82, and 83 under stringent hybridization conditions.

Additional representative humanized anti-5T4 antibodies of the invention include antibodies comprising (a) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:5, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:6; (b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:5, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:6; (c) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:7, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:8; (d) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:7, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:8; (e) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:9, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:10; (f) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:9, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:10; (g) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:11, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:12; (h) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:11, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:12; (i) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:11, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:19; (j) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:11, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:84; (k) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:11, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:8; and (l) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:11, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:8.

Also provided are antibody/drug conjugates for drug delivery comprising (a) a chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of the invention; and (b) a drug, which is directly or indirectly bound to the antibody. Representative drugs include therapeutic agents, such as cytotoxins, radioisotopes, immunomodulatory agents, anti-angiogenic agents, anti-proliferative agents, pro-apoptotic agents, chemotherapeutic agents, and therapeutic nucleic acids. A cytotoxin may be, for example, an antibiotic, an inhibitor of tubulin polymerization, an alkylating agent, a protein synthesis inhibitor, a protein kinase inhibitor, a phosphatase inhibitor, a topoisomerase inhibitor, or an enzyme. Antibiotic cytotoxins, such as calicheamicin, calicheamicin, N-acetyl-γ -calicheamicin, or derivatives

PCT/US05/32196

thereof such as N-acetyl- γ -calicheamicin dimethyl hydrazide, are particularly useful for anti-cancer therapies.

The disclosed anti-5T4 antibody/drug conjugates may include a linker for binding the antibody to the drug. Representative linkers include 4-(4'acetylphenoxy)butanoic acid (AcBut), 3-acetylphenyl acidic acid (AcPac), and 4-mercapto-4-methyl-pentanoic acid (Amide). The antibody/drug conjugates may also include polyethylene glycol or other agents to enhance drug incorporation.

The present invention further provides a method for preparing antibody/drug conjugates having the formula:

$$5T4Ab(-X-W)_m$$

wherein 5T4Ab is a chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment; X is a linker that comprises a product of any reactive group that may react with an anti-5T4 antibody; W is a drug; m is the average loading for a purified conjugation product; and $(-X-W)_m$ is a drug derivative. According to the method, the drug derivative is added to the chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment wherein the drug is 3-10% by weight of the chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment. The drug derivative and the chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment are then incubated in a non-nucleophilic, protein-compatible, buffered solution having a pH in a range from about 7 to 9 to produce an antibody/drug conjugate, wherein the solution further comprises (i) a suitable organic cosolvent, and (ii) one or more additives comprising at least one bile acid or its salt, and wherein the incubation is conducted at a temperature ranging from about 30°C to about 35°C for a period of time ranging from about 15 minutes to about 24 hours. The resultant conjugate is then subjected to a chromatographic separation process to separate antibody/drug conjugates with a loading in the range of 3-10% by weight drug and with low conjugated fraction (LCF) from unconjugated chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment, drug derivative, and aggregated conjugates. Antibody/drug conjugates produced by the method are also provided.

For delivery of a drug to 5T4-expressing cells, the present invention provides methods whereby cells are contacted with an antibody/drug conjugate comprising (i) a chimeric or humanized anti-5T4 antibody, and (ii) a drug which is bound to the humanized anti-5T4 antibody directly or indirectly. According to the disclosed methods, the drug is internalized within the target cell. Therapeutic methods are also disclosed herein, which comprise administering to the subject having a 5T4-positive cancer a therapeutically effective amount of an anti-5T4 antibody/drug conjugate comprising (i) a chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment, and (ii) a therapeutic agent which is bound to the humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment directly or indirectly. Anti-5T4 therapies of the invention may be combined with any other known therapy for improved

effect. A second therapeutic agent may be administered in combination with an anti-5T4 antibody/drug conjugate simultaneously or consecutively in any order.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the results of Western blot analysis to assess 5T4 expression in tumorigenic cell lines. Western blots were generated from lysates of cultured cells as well as from allografted tumors in nude mice. CT26/neo, CT26 mouse colon carcinoma cells expressing the neomycin resistance gene; CT26/5T4, CT26 cells expressing 5T4 antigen.

Figure 2 shows the results of Western blot analysis of CT26/5T4 and CT26/neo samples after exposure of the cell lines to biotin. Sample A is the fraction of 5T4 that has been biotinylated and capable of binding to avidin. Sample S is the residual amount of 5T4 present in the supernatant after precipitation of the cell extract with avidin. This represents a fraction that has not been biotinylated and is therefore located in the cell plasma. 5T4 is detected in both membrane (A) and intracellular (S) fractions.

Figures 3A-3B show the results of experiments to quantify intracellular versus membrane-associated 5T4 antigen. Figure 3A shows Western blots prepared using CT26/5T4 cell extracts diluted as indicated. The biotinylated sample represents the residual amount of 5T4 present in the sample following depletion of the biotinylated sample using avidin, *i.e.*, the amount of non-membrane-associated 5T4. The total sample represents the sum of the residual amount and the amount depleted by avidin, *i.e.*, amount of non-membrane-associated and membrane associated 5T4 antigen. Figure 3B shows the linear regression curves determined by the dilution of the sample and the optical density of the H8-reactive band. The amount of membrane-associated 5T4 antigen is depicted as the difference between the optical density of the total sample and the optical density of the biotinylated sample after avidin depletion. As described in Example 1, the amount of 5T4 on the cell membrane (5T4M) was calculated to be 24% of total cellular 5T4 in CT26/5T4 cells.

Figure 4 shows Western blot results that demonstrate 5T4 antigen on the cell surface of CT26/5T4 cells, DLD-1 cells (human colon carcinoma cells), N87 cells (human gastric carcinoma cells), PC3-MM2 cells (human prostate carcinoma cells), and PC3 cells (human prostate carcinoma cells).

Figures 5A-5B show results of FACS analysis to detect membrane localization of 5T4 antigen. In MDAMB435/neo cells, the signal of H8 coincides with that of a control IgG (Figure 5A). In contrast, in MDAMB435/5T4 cells, the signal resulting from the H8 antibody is more than 100-fold greater than that of the control antibody, indicating the presence of 5T4 on the cell membrane (Figure 5B). Black, detection of 5T4 antigen; gray, detection by a control IgG.

Figure 6 show results of FACS analysis to detect 5T4 antigen on the membranes of N87 (human gastric carcinoma cells), PC14PE6 (human lung carcinoma cells), and NCI-H157 cells (human lung carcinoma cells). In each case, the signal resulting from the H8 antibody is about 10-fold greater than that of the control antibody, indicating the presence of 5T4 on the cell membrane. Gray, detection of 5T4 antigen; black, detection by a control IgG.

Figure 7 is a line graph depicting measurements of fluorescently labeled H8 antibody detected on the cell surface of CT26/5T4 cells and in the cell culture medium. The mean fluorescence of membrane-associated antibody decreased as a function of time. The antibody was not released in the medium. These results demonstrate that the H8 antibody/5T4 complex is internalized by CT26/5T4 cells.

Figure 8 is a line graph depicting selective cytolysis of MDAMB435/5T4 cells exposed to an anti-5T4 conjugate comprising H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-mercapto-4-methyl-pentanoic acid as a linker.

Figures 9A-9B are line graphs that depict selective cytolysis of 5T4-expressing cells exposed to an anti-5T4 conjugate (H8PEG2K-AcBut-CalichDMH) comprising PEGylated H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-(4'-acetylphenoxy)butanoic acid (AcBut) as a linker. *See* Example 2. Figure 9A shows that MDAMB435/neo cells lacking 5T4 antigen are approximately equally susceptible to cytolysis by H8PEG2K-AcBut-CalichDMH as by free calicheamicin. Figure 9B shows enhanced cytolysis of 5T4-expressing cells exposed to H8PEG2K-AcBut-CalichDMH as compared to free calicheamicin.

Figure 10 is a line graph that depicts growth inhibition of MDAMB435/5T4 tumors exposed to H8-calicheamicin conjugates prepared using the indicated linkers. PBS, phosphate buffered saline; H8-AcBut-CalichDMH, H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-(4'-acetylphenoxy)butanoic acid (AcBut); H8-AcPac-CalichDMH, H8 antibody conjugated to calicheamicin using 3-acetylphenyl acidic acid; H8-Amide-CalichDMH, H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-mercapto-4-methyl-pentanoic acid; H8PEG(mal2)-AcBut-CalichDMH, PEGylated H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-(4'-acetylphenoxy)butanoic acid (AcBut).

Figures 11A-11B are line graphs that depict growth inhibition of MDAMB435/5T4 tumors in the presence of control substances (Figure 11A) or H8-calicheamicin conjugates (Figure 11B). CMA, anti-CD33 antibody conjugated to calicheamicin (negative control, *i.e.*, used to assess cytotoxicity due to tumor uptake of a conjugate by cells lacking the targeted antigen); PBS, phosphate buffered saline; H8+CalichDMH, a mixture of H8 antibody and calicheamicin (unconjugated); CalichDMH, free calicheamicin; H8-AcPac-CalichDMH, H8 antibody conjugated to calicheamicin using 3-acetylphenyl acidic acid; H8-amide-CalichDMA, H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-mercapto-4-methyl-pentanoic acid.

Figure 12 is a line graph that depicts growth inhibition of NCI-H157 tumors exposed to the indicated H8-calicheamicin conjugates or control substances. H8-AcPac-CalichDMH, H8 antibody conjugated to calicheamicin using 3-acetylphenyl acidic acid; H8-amide-CalichDMA, H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-mercapto-4-methyl-pentanoic acid; CMA, anti-CD33 antibody conjugated to calicheamicin (negative control); PBS, phosphate buffered saline; H8, unconjugated H8 antibody.

Figures 13A-13B are line graphs that depict growth inhibition of N87 tumors in the presence of control substances (Figure 13A) or H8-calicheamicin conjugates (Figure 13B). CMA, anti-CD33 antibody conjugated to calicheamicin (positive control); PBS, phosphate buffered saline; H8+CalichDMH, a mixture of H8 antibody and calicheamicin (unconjugated); CalichDMH, free calicheamicin; H8-AcPac-CalichDMH, H8 antibody conjugated to calicheamicin using 3-acetylphenyl acidic acid; H8-amide-CalichDMA, H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-mercapto-4-methyl-pentanoic acid.

Figure 14 is a line graph that depicts growth inhibition of PC14PE6 tumors exposed to H8/calicheamicin conjugates or control substances. H8-AcPac-CalichDMH, H8 antibody conjugated to calicheamicin using 3-acetylphenyl acidic acid; H8-amide-CalichDMA, H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-mercapto-4-methyl-pentanoic acid; CMA, anti-CD33 antibody conjugated to calicheamicin (negative control); PBS, phosphate buffered saline; H8, unconjugated H8 antibody.

Figures 15A-15G are images of normal and tumor-infested lungs of an orthotopic model of lung cancer. Figure 15A is a picture of an excised normal mouse lung; the heart appears dark. Figure 15B is a picture of an excised mouse lung infested with tumor nodules following intravenous injection of PC14PE6 tumor cells (*see* Example 4); H, heart. Figure 15C is a macroscopic image (4X magnification) showing the thorax after collapse of the lungs. Lung nodules (LN) are distinguishable from normal lung tissue (L). The thoracic cavity was filled with hemorrhagic fluid (pleural effusion, PE). Figures 15D-15G are photomicrographs of hematoxylin and eosin stained sections of paraffin-embedded lung and heart tissue, which demonstrate the extent of tumor infiltration and destruction of normal tissue. Figures 15D-15E show infiltrates of tumor cells in the pleural cavity (15D) and the pericardium (15E). Figures 15F-15G show the reduction of functional lung tissue by proliferating tumor tissue in the perialveolar space.

Figure 16 is a line graph showing the surviving fraction (%) of mice bearing orthotopic lung tumors that have received the indicated treatments. All treatments were administered intraperitoneally 6 days after injection of the PC14PE6 cells. *See* Example 4. H8 (thick solid black line), unconjugated murine H8 antibody; PBS (solid white line), phosphate-buffered saline; CMA 2 (thin solid black line), anti-CD33 antibody conjugated to calicheamicin administered at a dose of 2 μg calicheamicin; CMA 4 (line with small dashes), anti-CD33

antibody conjugated to calicheamicin administered at a dose of 4 μg calicheamicin; H8-AcPac-CalichDMH 2 (line with large dashes), H8-calicheamicin conjugate administered at a dose of 2 μg calicheamicin; H8-AcPac-CalichDMH 4 (line with large dashes), H8-calicheamicin conjugate administered at a dose of 4 μg calicheamicin. The results for H8-calicheacmicin conjugate administered at a dose of 2 μg or at a dose of 4 μg were indistinguishable over a period of 120 days. Ten animals were included in each treatment group. Each treatment regimen consisted of 3 doses administered intraperitoneally with 4 days interval between each dose.

Figure 17 is a bar graph showing pleural volumes in mice that died from lung tumors following the indicated control treatments. PBS, phosphate buffered saline; H8, unconjugated H8 antibody; CMA 2, f anti-CD33 antibody conjugated to calicheamicin administered at 2 μg per dose; CMA 4, anti-CD33 antibody conjugated to calicheamicin administered at 4 μg per dose; n, number of animals. Pleural effusion volume was not reduced following administration of unconjugated H8 antibody or the control conjugate CMS.

Figure 18 is an alignment of the murine H8 light chain variable region (amino acids 21-127 of SEQ ID NO:16) and the DPK24 germ line clone (SEQ ID NO:63). Boxed sequences, CDRs; asterisks, positions at which amino acids of murine H8 are maintained in humanized H8 light chain variable region version 1, and at which amino acids of human DPK24 are maintained in humanized light chain variable region version 2; underlined residues, mutations that increase antibody expression.

Figure 19 is an alignment of human light chain variable region sequences of subgroup VκII (SEQ ID NOs:65-70) and the murine H8 light chain variable region (amino acids 21-127 of SEQ ID NO:16). Residues that differ in human framework sequences when compared to H8 framework sequences are underlined. For humanization of H8, one or more residues at the corresponding positions in H8 is substituted with a residue of a human framework sequence. Boxed sequences, CDRs.

Figure 20 is an alignment of human light chain variable region sequences of subgroup Vκ (SEQ ID NOs:71-80) and the murine H8 light chain variable region (amino acids 21-127 of SEQ ID NO:16). For humanization of H8, one or more residues at the corresponding positions in H8 is substituted with a residue of a human framework sequence. Boxed sequences, CDRs.

Figure 21 is an alignment of the murine H8 heavy chain variable region (amino acids 20-139 of SEQ ID NO:14) and the DP75 germ line clone (SEQ ID NO:64). Boxed sequences, CDRs; asterisks, positions at which amino acids of murine H8 are maintained in humanized H8 heavy chain variable region version 1 (*i.e.*, K38, S40, and I48), and at which

amino acids of human DP75 are maintained in humanized heavy chain variable region version 2.

Figure 22 is an alignment of human heavy chain variable region sequences of subgroup I (SEQ ID NOs:52-60) and the consensus framework sequences derived there from (SEQ ID NO:49-51).

Figure 23 is an alignment of the murine H8 heavy chain variable region (amino acids 20-139 of SEQ ID NO:14) and the humanized H8 heavy chain variable region derived from the consensus sequence of heavy chain variable region subgroup I, *i.e.*, humanized heavy chain variable region version 3 (SEQ ID NO:19). Boxed sequences, CDRs.

Figures 24A-24C show sequences of representative light chain variable region sequences (Figure 24A) and heavy chain variable region sequences (Figures 24B-24C) of humanized anti-5T4 antibodies.

Figures 25A-25O show the results of BLAST analysis performed using humanized variable regions as query sequences. *See also* Tables 6 and 7.

Figures 26A-26B shows the sequences of representative human constant regions used to prepare humanized anti-5T4 antibodies.

Figures 27A-27G show the light chain and heavy chain amino acid sequences of representative anti-5T4 antibodies. Figure 27A shows a chimeric anti-5T4 antibody having (a) a light chain comprising the murine H8 light chain variable region and a human kappa constant region (SEQ ID NO:1), and (b) a heavy chain comprising the murine H8 heavy chain variable region and a human IgG1 constant region (SEQ ID NO:2). Figure 27B shows a chimeric anti-5T4 antibody having (a) a light chain comprising the murine H8 light chain variable region and a human kappa constant region (SEQ ID NO:3), and (b) a heavy chain comprising the murine H8 heavy chain variable region and a mutated human IgG4 constant region (SEQ ID NO:4). Figure 27C shows a semi-human anti-5T4 antibody having (a) a light chain comprising the humanized H8 light chain variable region version 1 and a human kappa constant region (SEQ ID NO:5), and (b) a heavy chain comprising the murine H8 heavy chain variable region and a mutated human IgG4 constant region (SEQ ID NO:6). Figure 27D shows a humanized anti-5T4 antibody having (a) a light chain comprising the humanized H8 light chain variable region version 1 and a human kappa constant region (SEQ ID NO:7), and (b) a heavy chain comprising the humanized H8 heavy chain variable region version 1 and a mutated human IgG4 constant region (SEQ ID NO:8). Figure 27E shows a humanized anti-5T4 antibody having (a) a light chain comprising the humanized H8 light chain variable region version 1 and a human kappa constant region (SEQ ID NO:9), and (b) a heavy chain comprising the humanized H8 heavy chain variable region version 2 and a human IgG1 constant region (SEQ ID NO:10). Figure 27F shows a humanized anti-5T4 antibody having (a) a light chain comprising the humanized H8 light chain variable

region version 2 and a human kappa constant region (SEQ ID NO:11), and (b) a heavy chain comprising the humanized H8 heavy chain variable region version 2 and a mutated human IgG4 constant region (SEQ ID NO:12). Figure 27G shows a humanized anti-5T4 antibody having (a) a light chain comprising the humanized H8 light chain variable region version 2 and a human kappa constant region (SEQ ID NO:11), and (b) a heavy chain comprising the humanized H8 heavy chain variable region version 3 and a mutated human IgG4 constant region (SEQ ID NO:84). Single underlining, variable regions; boxed sequences, CDRs; asterisk, proline mutation.

Figures 28A-28B show results of FACS analysis to detect 5T4 antigen on MDAMB435/neo cells (Figure 28A) or on MDAMB435/5T4 cells (Figure 28B) using murine H8, chimeric versions of H8, and humanized versions of H8 at the indicated concentrations. All antibodies show selective binding to MDAMB435/5T4 cells.

Figure 29 is a line graph that shows the binding properties of chimeric H8 antibody and humanized H8 versions 1-3, which were determined using a competitive binding assay. The IC50 for the chimeric H8 antibody and humanized H8 versions 1-3 were 1.0 X 10^{-9}M, 1.0 X 10^{-9}M, 1.4 X 10^{-9}M, and 1.5 X 10^{-9}M, respectively. *See* Example 5.

Figure 30 is a line graph that shows detection of chimeric H8 antibody and humanized H8 antibody on the cell surface of MDAMB435/5T4 cells over a period of 25 hours. The reduced level of detection over the observation period demonstrates internalization of both antibodies. No detectable antibody was present in the conditioned medium during the course of the experiment.

Figure 31 is a bar graph depicting levels of transient expression of chimeric H8 antibody and humanized H8 versions 1-3 in COS-1 cells. The three humanized H8 antibodies were expressed at a similar level (version 1, 4.4 mg/L/48hours; version 2, 2.7 mg/L/48hours; version 3, 3.9 mg/L/48hours) which was greater than that observed for chimeric H8 antibody (0.6 mg/L/48hours). *See* Example 6.

Figures 32A-32B are line graphs that show inhibition of spheroid growth of MDAMB435/neo and MDAMB435/5T4 cells *in vitro* following 144 hours of exposure to H8-AcBut-CalichDMH, (humanized H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-(4'-acetylphenoxy)butanoic acid (AcBut)) at the indicated concentrations.

Figures 33A-33C are line graphs that depict growth inhibition of N87 tumors in the presence of control substances (Figure 33A) or humanized H8-calicheamicin conjugates (Figure 33B) and response calculations (Figure 33C). PBS, phosphate buffered saline; huH8+CalichDMH, a mixture of H8 antibody and calicheamicin (unconjugated); CMA, anti-CD33 antibody conjugated to calicheamicin; CMC, anti-CD22 antibody conjugated to calicheamicin; huH8-AcBut-CalichDMH, humanized H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-(4'-acetylphenoxy)butanoic acid (AcBut); (4), antibody-calicheamicin conjugate

PCT/US05/32196

administered at a dose of 4 μg calicheamicin; (2), antibody-calicheamicin conjugate administered at a dose of 2 μg calicheamicin; (1), antibody-calicheamicin conjugate administered at a dose of 1 μg calicheamicin; arrows, dosing schedule on days 1, 5, and 9; CR, complete response; PR, partial response; TR, no response; NR, no response. *See* Example 9.

Figures 34A-34C are line graphs that depict growth inhibition of MDAMB435/5T4 tumors in the presence of control substances (Figure 34A) or humanized H8-calicheamicin conjugates (Figure 34B) and response calculations (Figure 34C). PBS, phosphate buffered saline; huH8+CalichDMH, a mixture of H8 antibody and calicheamicin (unconjugated); CMA, anti-CD33 antibody conjugated to calicheamicin; CMC, anti-CD22 antibody conjugated to calicheamicin; huH8-AcBut-CalichDMH, humanized H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-(4'-acetylphenoxy)butanoic acid (AcBut); (4), antibody-calicheamicin conjugate administered at a dose of 4 μg calicheamicin; (2), antibody-calicheamicin conjugate administered at a dose of 2 μg calicheamicin; (1), antibody-calicheamicin conjugate administered at a dose of 1 μg calicheamicin arrows, dosing schedule on days 1, 5, and 9; CR, complete response; PR, partial response; TR, no response; NR, no response. *See* Example 9.

Figures 35A-35E are line graphs that depict growth inhibition of PC14PE6 tumors in the presence of control substances (Figure 35A) or humanized H8-calicheamicin conjugates (Figures 35B, 35D, 35E) and calculated responses (Figure 35C). Figures 35A-35C present data pertaining to new growth tumors, and Figure 35D presents data pertaining to treatment of relapsed tumors. PBS, phosphate buffered saline; huH8+CalichDMH, a mixture of H8 antibody and calicheamicin (unconjugated); CMA, anti-CD33 antibody conjugated to calicheamicin; huH8-AcBut-CalichDMH, humanized H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-(4'-acetylphenoxy)butanoic acid (AcBut); (4), antibody-calicheamicin conjugate administered at a dose of 4 μg calicheamicin; (2), antibody-calicheamicin conjugate administered at a dose of 2 μg calicheamicin; (1), antibody-calicheamicin conjugate administered at a dose of 1 μg calicheamicin; (4*), antibody-calicheamicin conjugate administered at a dose of 4 μg calicheamicin after tumors allowed to grow to approximately 1.08 cm^3 prior to treatment with the conjugate; arrows, dosing schedule on days 1, 5, and 9 (Figures 35A, 35B, and 35D) or days 19, 23, and 27 (Figure 35C); CR, complete response; PR, partial response; TR, no response; NR, no response. *See* Example 9.

Figures 36A-36B show photographs of mice harboring PC14PE6 tumors 21 days following treatment with vehicle (phosphate buffered saline) (Figure 36A) or with huH8-AcBut-CalichDMH (humanized H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-(4'-acetylphenoxy)butanoic acid (AcBut)) (Figure 36B). PC14PE6 tumors were approximately

PCT/US05/32196

80 mm^2 at the time vehicle or humanized H8-calicheamicin conjugate were administered. Agents were administered by intraperitoneal injection in a total of three doses of 4 µg calicheamicin per dose, each dose separated by three days. Arrow in Figure 36A identifies visible tumor. Area circumscribed by dotted line in Figure 36B identifies area where PC14PE6 tumor has regressed. *See* Example 9.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

I. Chimeric and Humanized Anti-5T4 Antibodies

H8 is a hybridoma-generated monoclonal mouse IgG1 antibody which is described in PCT International Publication No. WO 98/55607 and in Forsberg et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(19):124430-12436. Chimeric anti-5T4 antibodies of the invention include variable region sequences of the murine anti-5T4 antibody and additional residues derived from human antibody sequences. Humanized anti-5T4 antibodies of the invention include antigen binding residues from mouse anti-5T4 antibody H8 and additional residues derived from human antibody sequences. The disclosed chimeric and humanized anti-5T4 antibodies are therefore also called chimeric H8 antibodies and humanized H8 antibodies. Representative chimeric and humanized H8 antibodies are set forth in Figures 27A-27F.

The term antibody refers to an immunoglobulin protein, or antibody fragments that comprise an antigen binding site (*e.g.*, Fab, modified Fab, Fab', F(ab')$_2$ or Fv fragments, or a protein having at least one immunoglobulin light chain variable region or at least one immunoglobulin heavy chain region). Humanized antibodies of the invention include diabodies, tetrameric antibodies, single chain antibodies, tretravalent antibodies, multispecific antibodies (*e.g.*, bispecific antibodies), domain-specific antibodies that recognize a particular epitope (*e.g.*, antibodies that recognize an epitope bound by the H8 antibody).

The term anti-5T4 antibody refers to an antibody that specifically binds to 5T4 antigen, particularly human 5T4 antigen. The 5T4 antigen is a 72 kDa non-glycosylated phosphoprotein found on the surface of trophoblast cells and numerous cancer cell types See Hole et al. (1988) *Br. J. Cancer* 57: 239-46, Hole et al. (1990) *Int. J. Cancer* 45: 179-184; PCT International Publication No. WO89/07947; U.S. Patent No. 5,869,053.

The term binding refers to an affinity between two molecules, for example, an antigen and an antibody. As used herein, specific binding means a preferential binding of an antibody to an antigen in a heterogeneous sample comprising multiple different antigens. The binding of an antibody to an antigen is specific if the binding affinity is at least about 10^{-7} M or higher, such as at least about 10^{-8} M or higher, including at least about 10^{-9} M or higher, at least about 10^{-11} M or higher, or at least about 10^{-12} M or higher. For example, specific

binding of an antibody of the invention to a human 5T4 antigen includes binding in the range of at least about 1×10^{-7} to about 1×10^{-12}. Specific binding of an antibody of the invention to a human 5T4 antigen also includes binding in the range of at least about 3×10^{-10} M to about 12×10^{-10} M, such as within the range of about 4×10^{-10} M to about 9×10^{-10} M, or such as within the range of about 7×10^{-10} M to about 12×10^{-10} M, or such as within the range of about 7×10^{-10} M to about 9×10^{-10} M, or such as within the range of about 9×10^{-10} M to about 12×10^{-10} M, or such as within the range of about 11×10^{-10} M to about 12×10^{-10} M, or greater binding affinities such as about 1.0×10^{-11} M to about 10×10^{-11} M, or about 1.0×10^{-11} M to about 5×10^{-11} M, or about 5.0×10^{-11} M to about 10×10^{-11} M. The phrase specifically binds also refers to selective targeting to 5T4-expressing cells when administered to a subject.

The term chimeric antibody is used herein to describe an antibody comprising sequences from at least two different species. Humanized antibodies are one type of chimeric antibody. A chimeric anti-5T4 antibody may comprise (a) a light chain variable region having an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:1 and a heavy chain variable region having an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:2; (b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:1 and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:2; or (c) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:3 and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:4.

The term humanized is used herein to describe an antibody, wherein variable region residues responsible for antigen binding (*i.e.*, residues of a complementarity determining region and any other residues that participate in antigen binding) are derived from a non-human species, while the remaining variable region residues (*i.e.*, residues of the framework regions) and constant regions are derived, at least in part, from human antibody sequences. Residues of the variable regions and variable regions and constant regions of a humanized antibody may also be derived from non-human sources. Variable regions of a humanized antibody are also described as humanized (*i.e.*, a humanized light or heavy chain variable region). The non-human species is typically that used for immunization with antigen, such as mouse, rat, rabbit, non-human primate, or other non-human mammalian species.

Representative chimeric and humanized anti-5T4 antibodies of the invention comprise at least one light chain or at least one heavy chain, or fragments thereof, wherein the chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment (a) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity of at least about 1×10^{-7} M to about 1×10^{-12} M; (b) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity greater than 1×10^{-11} M; (c) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity greater than 5×10^{-11} M; (d) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity greater than a binding affinity of murine H8 anti-5T4 antibody binding to human 5T4 antigen; (e) specifically targets 5T4-

expressing cells *in vivo*; (f) competes for binding to human 5T4 antigen with an antibody of any one of (a)-(e); (g) specifically binds to an epitope bound by any one of (a)-(e); or (h) comprises an antigen binding domain of any one of (a)-(e).

The murine H8 anti-5T4 antibody has been shown to recognize a conformational epitope proximal to transmembrane domain of 5T4. Glycosylation, which is important for structure and immunogenicity, and intramolecular disulphide bonds are required for binding of the antibody. It has also been shown that the H8 anti-5T4 antibody does not bind mouse 5T4, although there is 84% identity between mouse and human 5T4 and 6 of 7 N-linked glycosylation sites are conserved between the two. The N-terminal and C-terminal cysteines are also completely conserved between mouse and human 5T4. The murine H8 antibody has also been shown to bind human 5T4 when the N-linked glycosylation site at amino acid 192 is removed (Shaw et al. (2002) *Biochem J.* 365: 137-145). There is some evidence suggesting that the H8 anti-5T4 antibody does not bind a human/mouse 5T4 chimera having mouse LRR2 (residues 173-361 replacing human residues 173-355) and yet the antibody does bind to the reciprocal chimera. There is also evidence suggesting that both a chimeric H8 antibody and a humanized H8 antibody bind to a 5T4 chimera containing mouse residues 282-361. This evidence leads to the conclusion that the H8 epitope is located between amino acids 173 and 252. Additional evidence suggests that chimeric H8 may not bind to a human/mouse anti-5T4 chimera containing mouse residues 173-258, while a humanized H8 antibody has slight binding at higher concentrations.

Naturally occurring antibodies are tetrameric (H_2L_2) glycoproteins of about 150,000 daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. The two heavy chains are linked to each other by disulfide bonds and each heavy chain is linked to a light chain by a disulfide bond. Each of the light and heavy chains is further characterized by an amino-terminal variable region and a constant region. The term variable refers to the fact that certain portions of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies and substantially determine the binding affinity and specificity of each particular antibody for its particular antigen. The variable regions of each of light and heavy chain align to form the antigen-binding domain. Representative humanized H8 variable regions are set forth in Figures 24A-22C (SEQ ID NOs:17, 18, 19, 21, and 23).

Antibodies having a tetrameric structure, similar to naturally occurring antibodies, may be recombinantly prepared using standard techniques. Recombinantly produced antibodies also include single chain antibodies, wherein the variable regions of a single light chain and heavy chain pair include an antigen binding region, and fusion proteins, wherein a variable region of a humanized anti-5T4 antibody is fused to an effector sequence, such as an Fc domain, a cytokine, an immunostimulant, a cytotoxin, or any other therapeutic protein. *See e.g.*, Harlow & Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York and U.S. Patent Nos. 4,196,265; 4,946,778; 5,091,513; 5,132,405; 5,260,203; 5,677,427; 5,892,019; 5,985,279; 6,054,561.

Tetravalent antibodies (H_4L_4) comprising two intact tetrameric antibodies, including homodimers and heterodimers, may be prepared for example as described in PCT International Publication No. WO 02/096948. Antibody dimers may also be prepared via introduction of cysteine residue(s) in the antibody constant region, which promote interchain disulfide bond formation, using heterobifunctional cross-linkers (Wolff et al. (1993) *Cancer Res.* 53: 2560-5), or by recombinant production to include a dual constant region (Stevenson et al. (1989) *Anticancer Drug Des.* 3: 219-30).

The term complementarity determining region or CDR refers to residues of the antibody variable regions that participate in antigen binding. A number of definitions of the CDRs are in common use. The Kabat definition is based on sequence variability, and the Chothia definition is based on the location of the structural loop regions. The AbM definition is a compromise between the Kabat and Chothia approaches. The CDRs of the light chain variable region are bounded by the residues at positions 24 and 34 (CDR1-L), 50 and 56 (CDR2-L), and 89 and 97 (CDR3-L) according to the Kabat, Chothia, or AbM algorithm. According to the Kabat definition, the CDRs of the heavy chain variable region are bounded by the residues at positions 31 and 35B (CDR1-H), 50 and 65 (CDR2-H), and 95 and 102 (CDR3-H) (numbering according to Kabat). According to the Chothia definition, the CDRs of the heavy chain variable region are bounded by the residues at positions 26 and 32 (CDR1-H), 52 and 56 (CDR2-H), and 95 and 102 (CDR3-H) (numbering according to Chothia). According to the AbM definition, the CDRs of the heavy chain variable region are bounded by the residues at positions 26 and 35B (CDR1-H), 50 and 58 (CDR2-H), and 95 and 102 (CDR3-H) (numbering according to Kabat). *See* Martin et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9268–9272; Martin et al. (1991) *Methods Enzymol.* 203: 121–153; Pedersen et al. (1992) *Immunomethods* 1: 126; and Rees et al. (1996) in Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, pp. 141–172.

The term specificity determining region or SDR refers to those residues within CDRs that directly interact with antigen, which correspond to hypervariable residues. *See* (Padlan et al. (1995) *FASEB J.* 9: 133-9).

Framework residues are those residues of the variable region other than hypervariable residues. Representative human frameworks of a heavy chain variable region that may be used to prepare humanized anti-5T4 antibodies include the framework regions of DP-75 and DP-8(VH1-2), DP-25, VI-2b and VI-3 (VH1-03), DP-15 and V1-8 (VH1-08), DP-14 and V1-18 (VH1-18), DP-5 and V1-24P (VH1-24), DP-4 (VH1-45), DP-7 (VH1-46), DP-10, DA-6 and YAC-7 (VH1-69), DP-88 (VH1-e), DP-3, and DA-8 (VH1-f). Consensus framework sequences based on the foregoing individual sequences may also be used. *See*

Figures 21-23. Representative human frameworks of a light chain variable region include that of human germ line clone DPK24 and germ line clone subgroups VκII and Vκ, each of which shows greater than 60% amino acid identity when compared to the H8 light chain variable region. *See* Figures 18-20.

The constant regions of the disclosed humanized anti-5T4 antibodies are derived from constant regions from any one of IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, and any isotypes thereof (*e.g.*, IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4 isotypes of IgG). The choice of the human isotype (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) and modification of particular amino acids in the human isotype may enhance or eliminate activation of host defense mechanisms and alter biodistribution of a humanized antibody of the invention. *See* (Reff et al. (2002) *Cancer Control* 9: 152-66).

Humanized antibodies may be prepared using any one of a variety of methods including veneering, grafting of complementarity determining regions (CDRs), grafting of abbreviated CDRs, grafting of specificity determining regions (SDRs), and Frankenstein assembly, as described below. These general approaches may be combined with standard mutagenesis and synthesis techniques to produce an anti-5T4 antibody of any desired sequence.

Veneering is based on the concept of reducing potentially immunogenic amino acid sequences in a rodent or other non-human antibody by resurfacing the solvent accessible exterior of the antibody with human amino acid sequences. Thus, veneered antibodies appear less foreign to human cells. *See* Padlan (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-98. A non-human antibody is veneered by (1) identifying exposed exterior framework region residues in the non-human antibody, which are different from those at the same positions in framework regions of a human antibody, and (2) replacing the identified residues with amino acids that typically occupy these same positions in human antibodies.

Grafting of CDRs is performed by replacing one or more CDRs of an acceptor antibody (*e.g.*, a human antibody) with CDRs of a donor antibody (*e.g.*, a non-human antibody). Acceptor antibodies may be selected based on similarity of framework residues between a candidate acceptor antibody and a donor antibody and may be further modified to introduce similar residues. For example, a human acceptor framework may comprise a heavy chain variable region of a human sub-group I consensus sequence, optionally with non-human donor residues at one or more of positions 1, 28, 48, 67, 69, 71, and 93. As another example, a human acceptor framework may comprise a light chain variable region of a human sub-group I consensus sequence, optionally with non-human donor residues at one or more of positions 2, 3, 4, 37, 38, 45 and 60. Following CDR grafting, additional changes may be made in the donor and/or acceptor sequences to optimize antibody binding and functionality. *See e.g.*, PCT International Publication No. WO 91/09967.

PCT/US05/32196

Grafting of abbreviated CDRs is a related approach. Abbreviated CDRs include the specificity-determining residues and adjacent amino acids, including those at positions 27d-34, 50-55 and 89-96 in the light chain, and at positions 31-35b, 50-58, and 95-101 in the heavy chain (numbering convention of (Kabat et al. (1987)). *See* (Padlan et al. (1995) *FASEB J.* 9: 133-9). Grafting of specificity-determining residues (SDRs) is premised on the understanding that the binding specificity and affinity of an antibody combining site is determined by the most highly variable residues within each of the complementarity determining regions (CDRs). Analysis of the three-dimensional structures of antibody-antigen complexes, combined with analysis of the available amino acid sequence data was used to model sequence variability based on structural dissimilarity of amino acid residues that occur at each position within the CDR. *See* Padlan et al. (1995) *FASEB J.* 9: 133-139. Minimally immunogenic polypeptide sequences consisting of contact residues, which are referred to as specificity-determining residues (SDRs), are identified and grafted onto human framework regions.

According to the Frankenstein approach, human framework regions are identified as having substantial sequence homology to each framework region of the relevant non-human antibody, and CDRs of the non-human antibody are grafted onto the composite of the different human framework regions. A related method also useful for preparation of antibodies of the invention is described in U.S. Patent Application Publication No. 2003/0040606.

Humanized anti-5T4 antibodies disclosed herein typically comprise at least one humanized light chain variable region or heavy chain variable region. Thus, a humanized anti-5T4 antibody of the invention may comprise a light chain variable region prepared by veneering, grafting of abbreviated CDRs or SDRs, or Frankenstein assembly, as above, and a heavy chain variable region of a non-human antibody (*e.g.*, the H8 antibody or other non-human anti-5T4 antibody). Alternatively, a light chain variable region of a non-human antibody may be combined with a humanized heavy chain variable region.

Representative humanized anti-5T4 antibodies of the invention include (a) antibodies having one or more CDRs of a non-human anti-5T4 antibody selected from CDRs of the light chain variable region of SEQ ID NO:17 or the heavy chain variable region of SEQ ID NO:18, such as two or more CDRs selected from CDRs of the light chain variable region of SEQ ID NO:17 or the heavy chain variable region of SEQ ID NO:18; (b) antibodies having a light chain comprising a variable region having two or three CDRs of SEQ ID NO:17; and (c) antibodies having a heavy chain comprising a variable region having two or three CDRs of SEQ ID NO:18. Representative humanized anti-5T4 antibodies of the invention also include those antibodies having (a) a light chain variable region amino acid sequence set forth as SEQ ID NO:17 or 23; (b) a light chain variable region amino acid sequence that is at least

PCT/US05/32196

78% identical to SEQ ID NO:17; or (c) a light chain variable region amino acid sequence that is at least 81% identical to SEQ ID NO:23. A light chain variable region of a functional humanized anti-5T4 antibody (*i.e.*, an anti-5T4 antibody that specifically binds to 5T4 antigen) may be encoded by (a) a nucleic acid of SEQ ID NO:22 or SEQ ID NO:81; (b) a nucleic acid that is at least 90% identical to the nucleic acid of SEQ ID NO:22; (c) a nucleic acid that is at least 91% identical to the nucleic acid of SEQ ID NO:81; or (d) a nucleic acid that specifically hybridizes to the complement of SEQ ID NO:22 or SEQ ID NO:81 under stringent hybridization conditions, for example final wash conditions of 0.1X SSC at 65°C.

Representative humanized anti-5T4 antibodies of the invention further include those antibodies having (a) a heavy chain variable region amino acid sequence set forth as any one of SEQ ID NOs:18, 19, and 21; (b) a heavy chain variable region amino acid sequence that is at least 83% identical to SEQ ID NO:18; (c) a heavy chain variable region amino acid sequence that is at least 81% identical to SEQ ID NO:19; or (d) a heavy chain variable region amino acid sequence that is at least 86% identical to SEQ ID NO:21. A heavy chain variable region of a functional humanized anti-5T4 antibody (*i.e.*, an anti-5T4 antibody that specifically binds to 5T4 antigen) may be encoded by (a) a nucleic acid of any one of SEQ ID NOs:20, 82, and 83; (b) a nucleic acid that is at least 91% identical to the nucleic acid of SEQ ID NO:20; (c) a nucleic acid that is at least 94% identical to the nucleic acid of SEQ ID NO:82; (d) a nucleic acid that is at least 91% identical to the nucleic acid of SEQ ID NO:83; or (e) a nucleic acid that specifically hybridizes to the complement of any one of SEQ ID NOs:20, 82, and 83 under stringent hybridization conditions, for example final wash conditions of 0.1X SSC at 65°C.

A humanized anti-5T4 antibody may comprise (a) a light chain variable region having an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:5 and a heavy chain variable region having an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:6; (b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:5 and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:6; (c) a light chain variable region having an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:7 and a heavy chain variable region having an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:8; (d) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:7 and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:8; (e) a light chain variable region having an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:9 and a heavy chain variable region having an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:10; (f) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:9 and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:10; (g) a light chain variable region having an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:11 and a heavy chain variable region having an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:12; or (h) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:11 and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:12.

Humanized anti-5T4 antibodies of the invention may be constructed wherein the variable region of a first chain (*i.e.*, the light chain variable region or the heavy chain variable region) is humanized, and wherein the variable region of the second chain is not humanized (*i.e.*, a variable region of an antibody produced in a non-human species). These antibodies are referred to herein as semi-humanized antibodies. For example, an anti-5T4 antibody may comprise a humanized light chain variable region of SEQ ID NO:17 or 23, and a heavy chain variable region of a non-human anti-5T4 antibody, such as the murine H8 heavy chain variable region of SEQ ID NO:14. Alternatively, an anti-5T4 antibody may comprise a humanized light chain variable region of a non-human anti-5T4 antibody, such as the murine H8 light chain variable region of SEQ ID NO:16, and a humanized heavy chain variable region of any one of SEQ ID NOs:18, 19, or 21. Anti-5T4 non-human antibodies other than murine H8 may be used to prepare semi-humanized antibodies, for example the rat monoclonal antibody described by Woods et al. (2002) *Biochem. J.* 366: 353-65).

Variants of the disclosed humanized anti-5T4 antibodies may be readily prepared to include various changes, substitutions, insertions, and deletions, where such changes provide for advantages in use. For example, to increase the serum half life of the antibody, a salvage receptor binding epitope may be incorporated, if not present already, into the antibody heavy chain sequence. *See* U.S. Patent No. 5,739,277. Additional modifications to enhance antibody stability include modification of IgG4 to replace the serine at residue 241 with proline. *See* Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30: 105-108. Other useful changes include substitutions as required to optimize efficiency in conjugating the antibody with a drug. For example, an antibody may be modified at its carboxyl terminus to include amino acids for drug attachment, for example one or more cysteine residues may be added. The constant regions may be modified to introduce sites for binding of carbohydrates or other moieties.

Variants of humanized anti-5T4 antibodies of the invention may be produced using standard recombinant techniques, including site-directed mutagenesis, or recombination methods. A diversified repertoire of humanized anti-5T4 antibodies may be prepared via gene arrangement and gene conversion methods in transgenic non-human animals (U.S. Patent Publication No. 2003/0017534), which are then tested for relevant activities using functional assays. In particular embodiments of the invention, anti-5T4 variants are obtained using an affinity maturation protocol such as mutating the CDRs (Yang et al. (1995) *J. Mol. Biol.* 254: 392-403), chain shuffling (Marks et al. (1992) *Biotechnology (NY)* 10: 779-783), use of mutator strains of *E. coli* (Low et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 260: 359-368), DNA shuffling (Patten et al. (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 724-733), phage display (Thompson et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 256: 77-88), and sexual PCR (Crameri et al. (1998) *Nature* 391: 288-291). For immunotherapy applications, relevant functional assays include specific binding to

PCT/US05/32196

human 5T4 antigen, internalization of the antibody when conjugated to a cytotoxin, and targeting to a tumor site(s) when administered to a tumor-bearing animal, as described in the Examples. *See* Examples 1-11.

The present invention further provides cells and cell lines expressing humanized anti-5T4 antibodies of the invention. Representative host cells include mammalian and human cells, such as CHO cells, HEK-293 cells, HeLa cells, CV-1 cells, and COS cells. Methods for generating a stable cell line following transformation of a heterologous construct into a host cell are known in the art. Representative non-mammalian host cells include insect cells (Potter et al. (1993) *Int. Rev. Immunol.* 10(2-3):103-112). Antibodies may also be produced in transgenic animals (Houdebine (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* 13(6):625-629) and transgenic plants (Schillberg et al. (2003) *Cell Mol. Life Sci.* 60(3):433-45).

1.A. Chimeric and Humanized Anti-5T4 Nucleic Acids

The present invention further provides isolated nucleic acids encoding humanized anti-5T4 light and heavy chain variable regions. The isolated nucleic acids may be used to prepare a humanized anti-5T4 antibody, as disclosed herein.

The terms nucleic acid molecule and nucleic acid each refer to deoxyribonucleotides or ribonucleotides and polymers thereof in single-stranded, double-stranded, or triplexed form. Unless specifically limited, the term encompasses nucleic acids containing known analogues of natural nucleotides that have similar properties as the reference natural nucleic acid. The terms nucleic acid molecule or nucleic acid may also be used in place of gene, cDNA, mRNA, or cRNA. Nucleic acids may be synthesized, or may be derived from any biological source, including any organism. Representative methods for cloning nucleic acids that encode humanized anti-5T4 antibodies are described in Example 5.

Representative nucleic acids of the invention comprise the nucleotide sequence of any one of SEQ ID NOs:20, 22, 81, 82, or 83. Nucleic acids of the invention may also comprise a nucleotide sequence that is substantially identical to any one of SEQ ID NOs:20, 22, 81, 82, or 83, for example, at least 91% identical to any one of SEQ ID NOs:20, 81, or 83, or at least 90% identical to SEQ ID NO:22, or at least 94% identical to SEQ ID NO:82. Sequences are compared for maximum correspondence using a sequence comparison algorithm using the full-length sequence of any one of SEQ ID NOs:20, 22, 81, 82, or 83 as the query sequence, as described herein below, or by visual inspection. *See also* Example 5 and Table 6.

With respect to substantially identical nucleic acids having a specified minimal percentage identity to the disclosed humanized H8 variable region nucleic acids, the substantially identical sequences may also be at least about 92% identical to SEQ ID NO:20. 81, or 83, such as at least 93% identical, or at least 94% identical, or at least 95% identical,

PCT/US05/32196

or at least 96% identical, or at least 97% identical, or at least 98% identical, or at least 99% identical. Similarly, substantially identical sequences also include sequences that are at least about 91% identical to SEQ ID NO:22, for example, at least about 92% identical, or at least 93% identical, or at least 94% identical, or at least 95% identical, or at least 96% identical, or at least 97% identical, or at least 98% identical, or at least 99% identical; and sequences that are at least 95% identical to SEQ ID NO:82, such as at least 96% identical, or at least 97% identical, or at least 98% identical, or at least 99% identical.

Substantially identical sequences may be polymorphic sequences. The term polymorphic refers to the occurrence of two or more genetically determined alternative sequences or alleles in a population. An allelic difference may be as small as one base pair.

Substantially identical sequences may also comprise mutagenized sequences, including sequences comprising silent mutations. A mutation may comprise one or more residue changes, a deletion of one or more residues, or an insertion of one or more additional residues.

Substantially identical nucleic acids are also identified as nucleic acids that hybridize specifically to or hybridize substantially to the full length of any one of SEQ ID NOs:20, 22, 81, 82, and 83 under stringent conditions. In the context of nucleic acid hybridization, two nucleic acid sequences being compared may be designated a probe and a target. A probe is a reference nucleic acid molecule, and a target is a test nucleic acid molecule, often found within a heterogeneous population of nucleic acid molecules. A target sequence is synonymous with a test sequence.

A preferred nucleotide sequence employed for hybridization studies or assays includes probe sequences that are complementary to or mimic at least an about 14 to 40 nucleotide sequence of a nucleic acid molecule of the present invention. Preferably, probes comprise 14 to 20 nucleotides, or even longer where desired, such as 30, 40, 50, 60, 100, 200, 300, or 500 nucleotides or up to the full length of any one of SEQ ID NOs:20, 22, 81, 82, and 83. Such fragments may be readily prepared, for example by chemical synthesis of the fragment, by application of nucleic acid amplification technology, or by introducing selected sequences into recombinant vectors for recombinant production.

The phrase hybridizing specifically to refers to the binding, duplexing, or hybridizing of a molecule only to a particular nucleotide sequence under stringent conditions when that sequence is present in a complex nucleic acid mixture (*e.g.*, total cellular DNA or RNA).

The phrase hybridizing substantially to refers to complementary hybridization between a probe nucleic acid molecule and a target nucleic acid molecule and embraces minor mismatches that may be accommodated by reducing the stringency of the hybridization media to achieve the desired hybridization.

Stringent hybridization conditions and stringent hybridization wash conditions in the context of nucleic acid hybridization experiments such as Southern and Northern blot analysis are both sequence- and environment-dependent. Longer sequences hybridize specifically at higher temperatures. An extensive guide to the hybridization of nucleic acids is found in Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, part I chapter 2, Elsevier, New York, New York. Generally, highly stringent hybridization and wash conditions are selected to be about 5°C lower than the thermal melting point (T_m) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. Typically, under stringent conditions a probe will hybridize specifically to its target subsequence, but to no other sequences.

The T_m is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of the target sequence hybridizes to a perfectly matched probe. Very stringent conditions are selected to be equal to the T_m for a particular probe. An example of stringent hybridization conditions for Southern or Northern Blot analysis of complementary nucleic acids having more than about 100 complementary residues is overnight hybridization in 50% formamide with 1 mg of heparin at 42°C. An example of highly stringent wash conditions is 15 minutes in 0.1X SSC at 65°C. An example of stringent wash conditions is 15 minutes in 0.2X SSC buffer at 65°C. *See* Sambrook et al., eds (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, for a description of SSC buffer. Often, a high stringency wash is preceded by a low stringency wash to remove background probe signal. An example of medium stringency wash conditions for a duplex of more than about 100 nucleotides, is 15 minutes in 1X SSC at 45°C. An example of low stringency wash for a duplex of more than about 100 nucleotides, is 15 minutes in 4X to 6X SSC at 40°C. For short probes (*e.g.*, about 10 to 50 nucleotides), stringent conditions typically involve salt concentrations of less than about 1M Na^+ ion, typically about 0.01 to 1M Na^+ ion concentration (or other salts) at pH 7.0-8.3, and the temperature is typically at least about 30°C. Stringent conditions may also be achieved with the addition of destabilizing agents such as formamide. In general, a signal to noise ratio of 2-fold (or higher) than that observed for an unrelated probe in the particular hybridization assay indicates detection of a specific hybridization.

The following are examples of hybridization and wash conditions that may be used to identify nucleotide sequences that are substantially identical to reference nucleotide sequences of the present invention: a probe nucleotide sequence preferably hybridizes to a target nucleotide sequence in 7% sodium dodecyl sulphate (SDS), 0.5M $NaPO_4$, 1mM EDTA at 50°C followed by washing in 2X SSC, 0.1% SDS at 50°C; more preferably, a probe and target sequence hybridize in 7% sodium dodecyl sulphate (SDS), 0.5M $NaPO_4$, 1mM EDTA

at 50°C followed by washing in 1X SSC, 0.1% SDS at 50°C; more preferably, a probe and target sequence hybridize in 7% sodium dodecyl sulphate (SDS), 0.5M $NaPO_4$, 1mM EDTA at 50°C followed by washing in 0.5X SSC, 0.1% SDS at 50°C; more preferably, a probe and target sequence hybridize in 7% sodium dodecyl sulphate (SDS), 0.5M $NaPO_4$, 1mM EDTA at 50°C followed by washing in 0.1X SSC, 0.1% SDS at 50°C; more preferably, a probe and target sequence hybridize in 7% sodium dodecyl sulphate (SDS), 0.5M $NaPO_4$, 1mM EDTA at 50°C followed by washing in 0.1X SSC, 0.1% SDS at 65°C.

A further indication that two nucleic acid sequences are substantially identical is that proteins encoded by the nucleic acids are substantially identical, share an overall three-dimensional structure, or are biologically functional equivalents. These terms are defined further herein below. Nucleic acid molecules that do not hybridize to each other under stringent conditions are still substantially identical if the corresponding proteins are substantially identical. This may occur, for example, when two nucleotide sequences comprise conservatively substituted variants as permitted by the genetic code.

The term conservatively substituted variants refers to nucleic acid sequences having degenerate codon substitutions wherein the third position of one or more selected (or all) codons is substituted with mixed-base and/or deoxyinosine residues. *See* Batzer et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; and Rossolini et al. (1994) *Mol. Cell Probes* 8:91-98.

Nucleic acids of the invention also comprise nucleic acids complementary to any one of SEQ ID NOs:20, 22, 81, 82, and 83, and subsequences and elongated sequences of the nucleic acids and complementary nucleic acids of any one of SEQ ID NOs:20, 22, 81, 82, and 83.

The term complementary sequences, as used herein, indicates two nucleotide sequences that comprise antiparallel nucleotide sequences capable of pairing with one another upon formation of hydrogen bonds between base pairs. As used herein, the term complementary sequences means nucleotide sequences which are substantially complementary, as may be assessed by the same nucleotide comparison methods set forth below, or is defined as being capable of hybridizing to the nucleic acid segment in question under relatively stringent conditions such as those described herein. A particular example of a complementary nucleic acid segment is an antisense oligonucleotide.

The term subsequence refers to a sequence of nucleic acids that comprises a part of a longer nucleic acid sequence. An exemplary subsequence is a probe, described herein above, or a primer. The term primer as used herein refers to a contiguous sequence comprising about 8 or more deoxyribonucleotides or ribonucleotides, preferably 10-20 nucleotides, and more preferably 20-30 nucleotides of a selected nucleic acid molecule. The

primers of the invention encompass oligonucleotides of sufficient length and appropriate sequence so as to provide initiation of polymerization on a nucleic acid molecule of the present invention.

The term elongated sequence refers to an addition of nucleotides (or other analogous molecules) incorporated into the nucleic acid. For example, a polymerase (*e.g.*, a DNA polymerase) may add sequences at the 3' terminus of the nucleic acid molecule. In addition, the nucleotide sequence may be combined with other DNA sequences, such as promoters, promoter regions, enhancers, polyadenylation signals, intronic sequences, additional restriction enzyme sites, multiple cloning sites, and other coding segments. Thus, the invention also provides vectors comprising the disclosed nucleic acids, including vectors for recombinant expression, wherein a nucleic acid of the invention is operatively linked to a functional promoter.

The term operatively linked, as used herein, refers to a functional combination between a promoter region and a nucleotide sequence such that the transcription of the nucleotide sequence is controlled and regulated by the promoter region. Techniques for operatively linking a promoter region to a nucleotide sequence are known in the art.

The term vector is used herein to refer to a nucleic acid molecule having nucleotide sequences that enable its replication in a host cell. A vector may also include nucleotide sequences to permit ligation of nucleotide sequences within the vector, wherein such nucleotide sequences are also replicated in a host cell. Representative vectors include plasmids, cosmids, and viral vectors.

Nucleic acids of the present invention may be cloned, synthesized, altered, mutagenized, or combinations thereof. Standard recombinant DNA and molecular cloning techniques used to isolate nucleic acids are known in the art. Site-specific mutagenesis to create base pair changes, deletions, or small insertions are also known in the art. *See e.g.*, Sambrook et al. (eds.) (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Silhavy et al. (1984) Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover & Harnes (1995) DNA Cloning: A Practical Approach, 2nd ed. IRL Press at Oxford University Press, Oxford/New York; Ausubel (ed.) (1995) Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed. Wiley, New York.

I.B. Chimeric and Humanized Anti-5T4 Polypeptides

The present invention also provides isolated humanized anti-5T4 polypeptides. Representative light chain and heavy chain polypeptides of the invention are set forth as SEQ ID NOs:1-12. Representative light chain variable region polypeptide and heavy chain

variable region polypeptides are set forth as SEQ ID NOs:17 and 23 and SEQ ID NOs:18, 19, and 21, respectively.

The terms polypeptide and protein each refer to a compound made up of a single chain of amino acids joined by peptide bonds. The antibodies of the invention are alternately referred to as polypeptides or proteins. Polypeptides of the invention may comprise naturally occurring amino acids, synthetic amino acids, genetically encoded amino acids, non-genetically encoded amino acids, and combinations thereof. Polypeptides may include both L-form and D-form amino acids.

Representative non-genetically encoded amino acids include but are not limited to 2-aminoadipic acid; 3-aminoadipic acid; β-aminopropionic acid; 2-aminobutyric acid; 4-aminobutyric acid (piperidinic acid); 6-aminocaproic acid; 2-aminoheptanoic acid; 2-aminoisobutyric acid; 3-aminoisobutyric acid; 2-aminopimelic acid; 2,4-diaminobutyric acid; desmosine; 2,2'-diaminopimelic acid; 2,3-diaminopropionic acid; N-ethylglycine; N-ethylasparagine; hydroxylysine; allo-hydroxylysine; 3-hydroxyproline; 4-hydroxyproline; isodesmosine; allo-isoleucine; N-methylglycine (sarcosine); N-methylisoleucine; N-methylvaline; norvaline; norleucine; and ornithine.

Representative derivatized amino acids include, for example, those molecules in which free amino groups have been derivatized to form amine hydrochlorides, p-toluene sulfonyl groups, carbobenzoxy groups, t-butyloxycarbonyl groups, chloroacetyl groups or formyl groups. Free carboxyl groups may be derivatized to form salts, methyl and ethyl esters or other types of esters or hydrazides. Free hydroxyl groups may be derivatized to form O-acyl or O-alkyl derivatives. The imidazole nitrogen of histidine may be derivatized to form N-im-benzylhistidine.

The present invention also provides functional fragments of a humanized anti-5T4 polypeptide, for example, a variable region polypeptide. Functional polypeptide sequences that are longer than the disclosed sequences are also provided. For example, one or more amino acids may be added to the N-terminus or C-terminus of an antibody polypeptide. Such additional amino acids may be employed in a variety of applications, including but not limited to purification applications. Methods of preparing elongated proteins are known in the art.

Polypeptides of the invention include (a) a light chain variable-region polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO:17 or 23; (b) a light chain variable region polypeptide having an amino acid sequence that is at least 78% identical to SEQ ID NO:17; and (c) a light chain variable region polypeptide having an amino acid sequence at least 81% identical to SEQ ID NO:23. Additional polypeptides of the invention include (a) a heavy chain variable region polypeptide having the amino acid sequence set forth as any one of SEQ ID NOs:18, 19, and 21; (b) a heavy chain variable region polypeptide having an amino

acid sequence that is at least 83% identical to SEQ ID NO:18; (c) a heavy chain variable region polypeptide having an amino acid sequence that is at least 81% identical to SEQ ID NO:19; and (d) a heavy chain variable region polypeptide having an amino acid sequence that is at least 86% identical to SEQ ID NO:21. Sequences are compared for maximum correspondence using a sequence comparison algorithm using the full-length sequence of any one of SEQ ID NO:17, 18, 19, 21, or 23 as the query sequence, as described herein below, or by visual inspection. *See also* Example 5.

With respect to substantially identical polypeptides having a specified minimal percentage identity to the disclosed humanized H8 variable region polypeptides, substantially identical polypeptides may also be at least about 87% identical to the amino acid sequence of any one of SEQ ID NO:17, 18, 19, 21, or 23, such as at least 88% identical, or at least 89% identical, or at least 90% identical, or at least 91% identical, or at least 92% identical, or at least 93% identical, or at least 94% identical, or at least 95% identical, or at least 96% identical, or at least 97% identical, or at least 98% identical, or at least 99% identical. The invention further encompasses polypeptides encoded by any one of the nucleic acids disclosed herein.

Substantially identical proteins also include proteins comprising amino acids that are conservatively substituted variants of any one of the disclosed humanized variable region polypeptides and variable region antibodies. The term conservatively substituted variant refers to a polypeptide comprising an amino acid in which one or more residues have been conservatively substituted with a functionally similar residue and which specifically binds to human anti-5T4 with similar affinity as any of the disclosed chimeric and humanized H8 antibodies. The phrase conservatively substituted variant also includes peptides wherein a residue is replaced with a chemically derivatized residue.

Examples of conservative substitutions include the substitution of one non-polar (hydrophobic) residue such as isoleucine, valine, leucine or methionine for another; the substitution of one polar (hydrophilic) residue for another such as between arginine and lysine, between glutamine and asparagine, between glycine and serine; the substitution of one basic residue such as lysine, arginine or histidine for another; or the substitution of one acidic residue, such as aspartic acid or glutamic acid for another.

Isolated polypeptides of the invention may be purified and characterized using a variety of standard techniques that are known to the skilled artisan. *See e.g.*, Schröder & Lübke (1965) The Peptides. Academic Press, New York; Bodanszky (1993) Principles of Peptide Synthesis, 2nd rev. ed. Springer-Verlag, Berlin/ New York; Ausubel (ed.) (1995) Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed. Wiley, New York.

I.C. Nucleotide and Amino Acid Sequence Comparisons

The terms identical or percent identity in the context of two or more nucleotide or polypeptide sequences, refer to two or more sequences or subsequences that are the same or have a specified percentage of amino acid residues or nucleotides that are the same, when compared and aligned for maximum correspondence, as measured using one of the sequence comparison algorithms disclosed herein or by visual inspection.

The term substantially identical in regards to a nucleotide or polypeptide sequence means that a particular sequence varies from the sequence of a naturally occurring sequence by one or more deletions, substitutions, or additions, the net effect of which is to retain biological function of a humanized anti-5T4 nucleic acid or polypeptide.

For comparison of two or more sequences, typically one sequence acts as a reference sequence to which one or more test sequences are compared. When using a sequence comparison algorithm, test and reference sequences are entered into a computer program, subsequence coordinates are designated if necessary, and sequence algorithm program parameters are selected. The sequence comparison algorithm then calculates the percent sequence identity for the designated test sequence(s) relative to the reference sequence, based on the selected program parameters.

Optimal alignment of sequences for comparison may be conducted, for example, by the local homology algorithm of Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math* 2:482-489, by the homology alignment algorithm of Needleman & Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453, by the search for similarity method of Pearson & Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448, by computerized implementations of these algorithms (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), or by visual inspection. *See* generally, Ausubel (ed.) (1995) Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed. Wiley, New York.

A preferred algorithm for determining percent sequence identity and sequence similarity is the BLAST algorithm, which is described in Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Software for performing BLAST analyses is publicly available through the National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). The BLAST algorithm parameters determine the sensitivity and speed of the alignment. For comparison of two nucleotide sequences, the BLASTn default parameters are set at W=11 (wordlength) and E=10 (expectation), and also include use of a low-complexity filter to mask residues of the query sequence having low compositional complexity. For comparison of two amino acid sequences, the BLASTp program default parameters are set at W=3 (wordlength), E=10 (expectation), use of the BLOSUM62 scoring matrix, gap costs of existence=11 and extension=1, and use of a low-complexity filter to mask residues of the query sequence having low compositional complexity. *See* Example 5.

PCT/US2005/032196

I.D. Functional Assays

The present invention further discloses *in vitro* and *in vivo* assays to characterize activities of a humanized anti-5T4 antibody, including 5T4 binding activity, cellular internalization following binding to 5T4 antigen presented on a cell surface, and targeting to 5T4-expressing cells in a subject. When conjugated to a cytotoxin, the disclosed antibodies of the invention may elicit anti-cancer activity, including inhibition of growth of 5T4-expressing cancer cells and/or induction of cell death in 5T4-expressing cells. Humanized anti-5T4 antibodies of the invention may comprise one or more of the foregoing activities.

Techniques for detecting binding of humanized anti-5T4 antibodies to 5T4 antigen are known in the art, including for example, BIACORE® assays as described in Example 5. Additional representative techniques include centrifugation, affinity chromatography and other immunochemical methods. *See e.g.*, Manson (1992) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey, United States of America; Ishikawa (1999) Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay, Elsevier, Amsterdam/New York. Antigen binding assays may be performed using isolated 5T4 antigen or 5T4-expressing cells. *See* Examples 1 and 5.

The term anti-cancer activity is used to generally describe an ability to destroy existing cancer cells, or to delay or prevent growth of cancer cells. The term cancer refers to both primary and metastasized tumors and carcinomas of any tissue in a subject, including carcinomas and hematopoietic malignancies such as leukemias and lymphomas. *In vitro* assays for determining anti-cancer activity are described in Examples 2 and 8, and representative animal models are described in Examples 3, 4, and 9.

The term growth inhibitory is used herein to describe an ability of anti-5T4 antibodies to eliminate 5T4-expressing cells or to prevent or reduce proliferation of 5T4-expressing cells. As described in Examples 2-4 and 8-9, humanized anti-5T4 antibodies of the invention may inhibit cancer cell growth. Additional representative methods for rapid *in vitro* assessment of cell growth inhibition are described in Jones et al. (2001) *J. Immunol. Methods* 254:85-98.

An ability to induce cell death includes induction of programmed cell death, which is characterized by nuclear DNA degradation, nuclear degeneration and condensation, loss of membrane integrity, and phagocytosis. Representative assays to assess cell are described in Hoves et al. (2003) *Methods* 31:127-34; Peng et al. (2002) *Chin. Med. Sci. J.* 17:17-21; Yasuhara et al. (2003) *J. Histochem. Cytochem.* 51:873-85.

II. Anti-5T4 Antibody/Drug Conjugates

The present invention further provides antibody/drug conjugates comprising a chimeric or humanized anti-5T4 antibody of the invention. Also provided are methods for

preparing the antibody/drug conjugates, such that the drug is bound to the antibody either directly or indirectly. Antibody/drug conjugates of the invention have the general formula 5T4Ab(-X-W)$_m$

wherein:

5T4Ab is a chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment described herein;

X is a linker that comprises a product of any reactive group that may react with an anti-5T4 antibody of antibody fragment;

W is a drug;

m is the average loading for a purified conjugation product (*e.g.*, m such that the drug constitutes about 3 - 10% of the conjugate by weight); and

(-X-W)$_m$ is a drug derivative.

Also provided are methods for preparing antibody/drug conjugates of the invention. As one example, an antibody/drug conjugate of the formula 5T4Ab(-X-W)$_m$ may be prepared by (a) adding the drug derivative to the chimeric or humanized anti-5T4 antibody wherein the drug is 3-10% by weight of the chimeric or humanized anti-5T4 antibody; (b) incubating the drug derivative and the chimeric or humanized anti-5T4 antibody in a non-nucleophilic, protein-compatible, buffered solution having a pH in a range from about 7 to 9 to produce an antibody/drug conjugate, wherein the solution further compromises (i) a suitable organic cosolvent, and (ii) and one or more additives comprising at least one bile acid or its salt, and wherein the incubation is conducted at a temperature ranging from about 30°C to about 35°C for a period of time ranging from about 15 minutes to about 24 hours; and (c) subjecting the conjugate produced in step (b) to a chromatographic separation process to separate antibody/drug conjugates with a loading in the range of 3-10% by weight drug and with low conjugated fraction (LCF) from unconjugated chimeric or humanized anti-5T4 antibody, drug derivative, and aggregated conjugates.

II.A. Drugs

The term drug as used herein refers to any substance having biological or detectable activity, for example therapeutic agents, detectable labels, binding agents, etc., and prodrugs, which are metabolized to an active agent *in vivo*. The term drug also includes drug derivates, wherein a drug has been functionalized to enable conjugation with an antibody of the invention. Generally, these types of conjugates are referred to as immunoconjugates.

The term therapeutic agent refers to any composition that may be used to treat or prevent a condition in a subject in need thereof. In particular, drugs useful in the invention

will include anti-cancer drugs. 5T4-expressing cells include cancer cells from squamous/adenomatous lung carcinoma (non-small-cell lung carcinoma), invasive breast carcinoma, colorectal carcinoma, gastric carcinoma, squamous cervical carcinoma, invasive endometrial adenocarcinoma, invasive pancreas carcinoma, ovarian carcinoma, squamous vesical carcinoma, and choriocarcinoma.

Representative therapeutic drugs include cytotoxins, radioisotopes, chemotherapeutic agents, immunomodulatory agents, anti-angiogenic agents, anti-proliferative agents, pro-apoptotic agents, and cytostatic and cytolytic enzymes (*e.g.*, RNAses). A drug may also include a therapeutic nucleic acid, such as a gene encoding an immunomodulatory agent, an anti-angiogenic agent, an anti-proliferative agent, or a pro-apoptotic agent. These drug descriptors are not mutually exclusive, and thus a therapeutic agent may be described using one or more of the above-noted terms. For example, selected radioisotopes are also cytotoxins. Therapeutic agents may be prepared as pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above. Generally, conjugates having a radioisotope as the drug are referred to as radioimmunoconjugates and those having a chemotherapeutic agent as the drug are referred to as chemoimmunoconjugates.

Examples of suitable drugs for use in immunoconjugates include the taxanes, maytansines, CC-1065 and the duocarmycins, the calicheamicins and other enediynes, and the auristatins. Other examples include the anti-folates, vinca alkaloids, and the anthracyclines. Plant toxins, other bioactive proteins, enzymes (*i.e.*, ADEPT), radioisotopes, photosensitizers (*i.e.*, for photodynamic therapy) can also be used in immunoconjugates. In addition, conjugates can be made using secondary carriers as the cytotoxic agent, such as liposomes or polymers, for example.

The term cytotoxin generally refers to an agent that inhibits or prevents the function of cells and/or results in destruction of cells. Representative cytotoxins include antibiotics, inhibitors of tubulin polymerization, alkylating agents that bind to and disrupt DNA, and agents that disrupt protein synthesis or the function of essential cellular proteins such as protein kinases, phosphatases, topoisomerases, enzymes, and cyclins. Representative cytotoxins include, but are not limited to, doxorubicin, daunorubicin, idarubicin, aclarubicin, zorubicin, mitoxantrone, epirubicin, carubicin, nogalamycin, menogaril, pitarubicin, valrubicin, cytarabine, gemcitabine, trifluridine, ancitabine, enocitabine, azacitidine, doxifluridine, pentostatin, broxuridine, capecitabine, cladribine, decitabine, floxuridine, fludarabine, gougerotin, puromycin, tegafur, tiazofurin, adriamycin, cisplatin, carboplatin, cyclophosphamide, dacarbazine, vinblastine, vincristine, mitoxantrone, bleomycin, mechlorethamine, prednisone, procarbazine, methotrexate, flurouracils, etoposide, taxol, taxol analogs, platins such as cis-platin and carbo-platin, mitomycin, thiotepa, taxanes,

vincristine, daunorubicin, epirubicin, actinomycin, authramycin, azaserines, bleomycins, tamoxifen, idarubicin, dolastatins/auristatins, hemiasterlins, esperamicins and maytansinoids.

In particular embodiments of the invention, the cytotoxin is an antibiotic such as a calicheamicin, also called the LL-E33288 complex, for example, gamma-calicheamicin (γ_1). *See* U.S. Patent No. 4,970,198. Early studies with antibody conjugates of gamma calicheamicin hydrazide derivatives showed antigen-based cytotoxicity *in vitro* and activity in xenograft experiments. The therapeutic index of these conjugates was improved initially by using a less potent derivative, N-acetyl gamma. Stabilizing the disulfide bond that is present in all calicheamicin conjugates by adding dimethyl substituents made additional improvements. Additional examples of calicheamicins suitable for use in preparing antibody/drug conjugates of the invention are disclosed in U.S. Patent Nos. 4,671,958; 5,053,394; 5,037,651; 5,079,233; and 5,108,912; which are incorporated herein in their entirety. These compounds contain a methyltrisulfide that may be reacted with appropriate thiols to form disulfides, at the same time introducing a functional group such as a hydrazide or other functional group that is useful for conjugating calicheamicin to an anti-5T4 antibody. Stabilizing the disulfide bond that is present in all calicheamicin conjugates by adding dimethyl substituents made additional improvements. This led to the choice of N-acetyl gamma calicheamicin dimethyl hydrazide, or NAc-gamma DMH (CL-184,538), as one of the optimized derivatives for conjugation. Disulfide analogs of calicheamicin can also be used, for example, analogs described in U.S. Patent Nos. 5,606,040 and 5,770,710, which are incorporated herein in their entirety.

For radiotherapy applications, a chimeric or humanized anti-5T4 antibody of the invention may comprise a high energy radioisotope. The isotope may be directly bound to the antibody, for example, at a cysteine residue present in the antibody, or a chelator may be used to mediate the binding of the antibody and the radioisotope. Radioisotopes suitable for radiotherapy include but are not limited to α-emitters, β-emitters, and auger electrons. For diagnostic applications, useful radioisotopes include positron emitters and γ-emitters. A humanized anti-5T4 antibody of the invention may further be iodinated, for example on a tyrosine residue of the antibody, to facilitate detection or therapeutic effect of the antibody.

Representative radioisotopes that may be conjugated to an anti-5T4 antibody include ^{18}fluorine, ^{64}copper, ^{66}copper, ^{67}gallium, ^{68}gallium, ^{77}bromine, ^{80m}bromine, ^{96}ruthenium, ^{97}ruthenium, ^{103}ruthenium, ^{105}ruthenium, ^{99m}technetium, ^{107}mercury, ^{203}mercury, ^{122}iodine, ^{124}iodine, ^{125}iodine, ^{126}iodine, ^{131}iodine, ^{133}iodine, ^{111}Indium, ^{113}Indium, ^{99m}rhenium, ^{105}rhenium, ^{101}rhenium, ^{186}rhenium, ^{188}rhenium, ^{121}mtellurium, ^{99}technetium, ^{122m}tellurium, ^{125m}tellurium, ^{165}thulium, ^{167}thulium, ^{168}thulium, ^{90}yttrium, and nitride or oxide forms derived there from.

Other suitable radioisotopes include alpha emitters, such as ^{213}bismuth, ^{213}lead, and ^{225}actinium.

Angiogenesis and suppressed immune response play a central role in the pathogenesis of malignant disease and tumor growth, invasion, and metastasis. Thus, drugs useful in the methods of the present invention also include those able to induce an immune response and/or an anti-angiogenic response *in vivo*.

The term immune response is meant to refer to any response to an antigen or antigenic determinant by the immune system of a vertebrate subject, including humoral immune responses (*e.g.* production of antigen-specific antibodies) and cell-mediated immune responses (*e.g.* lymphocyte proliferation). Representative immunomodulatory agents include cytokines, xanthines, interleukins, interferons, and growth factors (*e.g.*, TNF, CSF, GM-CSF and G-CSF), and hormones such as estrogens (diethylstilbestrol, estradiol), androgens (testosterone, HALOTESTIN® (fluoxymesterone)), progestins (MEGACE® (megestrol acetate), PROVERA® (medroxyprogesterone acetate)), and corticosteroids (prednisone, dexamethasone, hydrocortisone).

Immunomodulatory agents useful in the invention also include anti-hormones that block hormone action on tumors and immunosuppressive agents that suppress cytokine production, downregulate self-antigen expression, or mask MHC antigens. Representative anti-hormones include anti-estrogens including for example tamoxifen, raloxifene, aromatase inhibiting 4(5)-imidazoles, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY 117018, onapristone, and toremifene; and anti-androgens such as flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; and anti-adrenal agents. Representative immunosuppressive agents include 2-amino-6-aryl-5-substituted pyrimidines, azathioprine, cyclophosphamide, bromocryptine, danazol, dapsone, glutaraldehyde, anti-idiotypic antibodies for MHC antigens and MHC fragments, cyclosporin A, steroids such as glucocorticosteroids, cytokine or cytokine receptor antagonists (*e.g.*, anti-interferon antibodies, anti-IL10 antibodies, anti-TNFα antibodies, anti-IL2 antibodies), streptokinase, TGFβ, rapamycin, T-cell receptor, T-cell receptor fragments, and T cell receptor antibodies.

Representative anti-angiogenic agents include inhibitors of blood vessel formation, for example, farnesyltransferase inhibitors, COX-2 inhibitors, VEGF inhibitors, bFGF inhibitors, steroid sulphatase inhibitors (*e.g.*, 2-methoxyoestradiol bis-sulphamate (2-MeOE2bisMATE)), interleukin-24, thrombospondin, metallospondin proteins, class I interferons, interleukin 12, protamine, angiostatin, laminin, endostatin, and prolactin fragments.

Anti-proliferative agents and pro-apoptotic agents include activators of PPAR-gamma (*e.g.*, cyclopentenone prostaglandins (cyPGs)), retinoids, triterpinoids (*e.g.*, cycloartane,

lupane, ursane, oleanane, friedelane, dammarane, cucurbitacin, and limonoid triterpenoids), inhibitors of EGF receptor (*e.g.*, HER4), rampamycin, CALCITRIOL® (1,25-dihydroxycholecalciferol (vitamin D)), aromatase inhibitors (FEMARA® (letrozone)), telomerase inhibitors, iron chelators (*e.g.*, 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (Triapine)), apoptin (viral protein 3 - VP3 from chicken anaemia virus), inhibitors of Bcl-2 and Bcl-X(L), TNF-alpha, FAS ligand, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L), activators of TNF-alpha/FAS ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) signaling, and inhibitors of PI3K-Akt survival pathway signaling (*e.g.*, UCN-01 and geldanamycin).

Representative chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and cyclosphosphamide; alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, triethylenephosphoramide, triethylenethiophosphoramide and trimethylolomelamine; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, calicheamicin, carabicin, carminomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine, 5-EU; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiostane, testolactone; anti-adrenal such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elfornithine; elliptinium acetate; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; razoxane; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2, 2', 2' -trichlorotriethylamine; urethan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside (Ara-C);

PCT/US05/32196

cyclophosphamide; thiotepa; taxoids, *e.g.* paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology of Princeton, New Jersey) and doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer of Antony, France); chlorambucil; gemcitabine; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine; platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitomycin C; mitoxantrone; vincristine; vinorelbine; navelbine; novantrone; teniposide; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronate; CPT-11; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoic acid; esperamicins; and capecitabine.

Additional therapeutic agents that may be conjugated to the chimeric and humanized anti-5T4 antibodies disclosed herein and used in accordance with the therapeutic methods of the present invention include but are not limited to photosensitizing agents (U.S. Patent Publication No. 2002/0197262 and U.S. Patent No. 5,952,329) for photodynamic therapy; magnetic particles for thermotherapy (U.S. Patent Publication No. 2003/0032995); binding agents, such as peptides, ligands, cell adhesion ligands, *etc.*, and prodrugs such as phosphate-containing prodrugs, thiophosphate-containing prodrugs, sulfate containing prodrugs, peptide containing prodrugs, β-lactam-containing prodrugs, substituted phenoxyacetamide-containing prodrugs or substituted phenylacetamide-containing prodrugs, 5-fluorocytosine and other 5-fluorouridine prodrugs that may be converted to the more active cytotoxic free drug.

For diagnostic methods using chimeric or humanized anti-5T4 antibodies, a drug may comprise a detectable label that may be used to detect the presence of 5T4-expressing cells *in vitro* or *in vivo*. Radioisotopes useful for clinical diagnostic applications include labels that are detectable *in vivo*, such as those labels that are detectable using scintigraphy, magnetic resonance imaging, or ultrasound. Useful scintigraphic labels include positron emitters and γ-emitters. Representative contrast agents for magnetic source imaging are paramagnetic or superparamagnetic ions (*e.g.*, iron, copper, manganese, chromium, erbium, europium, dysprosium, holmium and gadolinium), iron oxide particles, and water soluble contrast agents. For ultrasonic detection, gases or liquids may be entrapped in porous inorganic particles that are released as microbubble contrast agents. For *in vitro* detection, useful detectable labels include a fluorophore, an epitope, or a radioactive label.

II.B. Linker Molecules

Drugs are conjugated to chimeric and humanized anti-5T4 antibodies of the invention either directly or indirectly via a linker molecule. The linker molecule may be stable or hydrolyzable, whereby it is released following cellular entry. The major mechanisms by which the drug is cleaved from the antibody include hydrolysis in the acidic pH of the lysosomes (hydrazones, acetals, and cis-aconitate-like amides), peptide cleavage by lysosomal enzymes (the cathepsins and other lysosomal enzymes), and reduction of

disulfides. As a result of these varying mechanisms for cleavage, mechanisms of linking the drug to the antibody also vary widely and any suitable linker can be used. Preferably, the conjugation method produces a sample with minimal low conjugate fraction (LCF, the fraction of mostly unconjugated antibody), *i.e.* less than about 10%.

One example of a suitable conjugation procedure relies on the conjugation of hydrazides and other nucleophiles to the aldehydes generated by oxidation of the carbohydrates that naturally occur on antibodies. Hydrazone-containing conjugates can be made with introduced carbonyl groups that provide the desired drug-release properties. Conjugates can also be made with a linker that has a disulfide at one end, an alkyl chain in the middle, and a hydrazine derivative at the other end. The anthracyclines are one example of cytotoxins that can be conjugated to antibodies using this technology.

Linkers containing functional groups other than hydrazones have the potential to be cleaved in the acidic milieu of the lysosomes. For example, conjugates can be made from thiol-reactive linkers that contain a site other than a hydrazone that is cleavable intracellularly, such as esters, amides, and acetals/ketals. Camptothecin is one cytotoxic agent that can be conjugated using these linkers. Ketals made from a 5 to 7-member ring ketone and that has one of the oxygens attached to the cytotoxic agent and the other to a linker for antibody attachment also can be used. The anthracyclines are also an example of a suitable cytotoxin for use with these linkers.

Another example of a class of pH sensitive linkers are the cis-aconitates, which have a carboxylic acid juxtaposed to an amide bond. The carboxylic acid accelerates amide hydrolysis in the acidic lysosomes. Linkers that achieve a similar type of hydrolysis rate acceleration with several other types of structures can also be used. The maytansinoids are an example of a cytotoxin that can be conjugated with linkers attached at C-9.

Another potential release method for drug conjugates is the enzymatic hydrolysis of peptides by the lysosomal enzymes. In on example, a peptide is attached via an amide bond to para-aminobenzyl alcohol and then a carbamate or carbonate is made between the benzyl alcohol and the cytotoxic agent. Cleavage of the peptide leads to the collapse, or self-immolation, of the aminobenzyl carbamate or carbonate. The cytotoxic agents exemplified with this strategy include anthracyclines, taxanes, mitomycin C, and the auristatins. In one example, a phenol can also be released by collapse of the linker instead of the carbamate. In another variation, disulfide reduction is used to initiate the collapse of a para-mercaptobenzyl carbamate or carbonate.

Many of the cytotoxic agents conjugated to antibodies have little, if any, solubility in water and that can limit drug loading on the conjugate due to aggregation of the conjugate. One approach to overcoming this is to add solubilizing groups to the linker. Conjugates made with a linker consisting of PEG and a dipeptide can been used, including those having

PCT/US05/32196

a PEG di-acid, thiol-acid, or maleimide-acid attached to the antibody, a dipeptide spacer, and an amide bond to the amine of an anthracycline or a duocarmycin analogue. Another example is conjugates that are made with a PEG-containing linker disulfide bonded to a cytotoxic agent and amide bonded to an antibody. Approaches that incorporate PEG groups may be beneficial in overcoming aggregation and limits in drug loading.

Representative linkers preferred for preparation of antibody/drug conjugates of the invention include linkers of the formula:

$(CO - Alk^1 - Sp^1 - Ar - Sp^2 - Alk^2 - C(Z^1) = Q - Sp)$

wherein

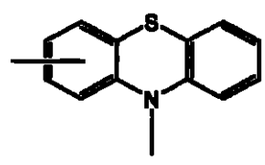
Alk^1 and Alk^2 are independently a bond or branched or unbranched (C_1-C_{10}) alkylene chain;

Sp^1 is a bond, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, -NR'-, $-N(CH_2CH_2)_2N-$, or -X-Ar'-Y-$(CH_2)_n$-Z wherein X, Y, and Z are independently a bond, -NR'-, -S-, or -O-, with the proviso that when n = 0, then at least one of Y and Z must be a bond and Ar' is 1,2-, 1,3-, or 1,4-phenylene optionally substituted with one, two, or three groups of (C_1-C_8) alkyl, (C_1-C_4) alkoxy, (C_1-C_4) thioalkoxy, halogen, nitro, -COOR', -CONHR', $-(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, or $-S(CH_2)_nCONHR'$, with the proviso that when Alk^1 is a bond, Sp^1 is a bond;

n is an integer from 0 to 5;

R' is a branched or unbranched (C_1-C_8) chain optionally substituted by one or two groups of -OH, (C_1-C_4) alkoxy, (C_1-C_4) thioalkoxy, halogen, nitro, (C_1-C_8) dialkylamino, or (C_1-C_8) trialkylammonium -A^- where A^- is a pharmaceutically acceptable anion completing a salt;

Ar is 1,2-, 1,3-, or 1,4-phenylene optionally substituted with one, two, or three groups of (C_1-C_8) alkyl, (C_1-C_8) alkoxy, (C_1-C_4) thioalkoxy, halogen, nitro, -COOR', -CONHR', $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, or $-S(CH_2)_nCONHR'$ wherein n and R' are as hereinbefore defined or a 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6-, or 2,7-naphthylidene or



with each naphthylidene or phenothiazine optionally substituted with one, two, three, or four groups of (C_1-C_8) alkyl, (C_1-C_8) alkoxy, (C_1-C_4) thioalkoxy, halogen, nitro, -COOR', -CONHR', $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, or $-S(CH_2)_nCONHR'$ wherein n and R' are as defined above, with the proviso that when Ar is phenothiazine, Sp^1 is a bond only connected to nitrogen;

Sp^2 is a bond, -S-, or -O-, with the proviso that when Alk^2 is a bond, Sp^2 is a bond;

Z^1 is H, (C_1-C_8) alkyl, or phenyl optionally substituted with one, two, or three groups of (C_1-C_8) alkyl, (C_1-C_8) alkoxy, (C_1-C_4) thioalkoxy, halogen, nitro, -COOR', -ONHR', $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, or $-S(CH_2)_nCONHR'$ wherein n and R' are as defined above;

Sp is a straight or branched-chain divalent or trivalent (C_1-C_{18}) radical, divalent or trivalent aryl or heteroaryl radical, divalent or trivalent (C_3-C_{18}) cycloalkyl or heterocycloalkyl radical, divalent or trivalent aryl- or heteroaryl-aryl (C_1-C_{18}) radical, divalent or trivalent cycloalkyl- or heterocycloalkyl-alkyl (C_1-C_{18}) radical or divalent or trivalent (C_2-C_{18}) unsaturated alkyl radical, wherein heteroaryl is preferably furyl, thienyl, N-methylpyrrolyl, pyridinyl, N-methylimidazolyl, oxazolyl, pyrimidinyl, quinolyl, isoquinolyl, N-methylcarbazoyl, aminocoumarinyl, or phenazinyl and wherein if Sp is a trivalent radical, Sp may be additionally substituted by lower (C_1-C_8) dialkylamino, lower (C_1-C_8) alkoxy, hydroxy, or lower (C_1-C_8) alkylthio groups; and

Q is =NHNCO-, =NHNCS-, =NHNCONH-, =NHNCSNH-, or =NHO-.

Preferably, Alk^1 is a branched or unbranched (C_1-C_{10}) alkylene chain; Sp' is a bond, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, or -NR' wherein R' is as hereinbefore defined, with the proviso that when Alk^1 is a bond, Sp^1 is a bond;

Ar is 1,2-, 1,3-, or 1,4-phenylene optionally substituted with one, two, or three groups of (C_1-C_8) alkyl, (C_1-C_8) alkoxy, (C_1-C_4) thioalkoxy, halogen, nitro, -COOR', -CONHR', $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, or $-S(CH_2)_nCONHR'$ wherein n and R' are as hereinbefore defined, or Ar is a 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6-, or 2,7-naphthylidene each optionally substituted with one, two, three, or four groups of (C_1-C_8) alkyl, (C_1-C_8) alkoxy, (C_1-C_4) thioalkoxy, halogen, nitro, -COOR', -CONHR', $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, or $-S(CH_2)_nCONHR'$.

Z^1 is (C_1-C_8) alkyl, or phenyl optionally substituted with one, two, or three groups of (C_1-C_8) alkyl, (C_1-C_4) alkoxy, (C_1-C_4) thioalkoxy, halogen, nitro, -COOR', -CONHR', $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, or $-S(CH_2)_nCONHR'$; Alk^2 and Sp^2 are together a bond; and Sp and Q are as immediately defined above.

U.S. Patent No. 5,773,001, incorporated herein in its entirety, discloses linkers that may be used with nucleophilic drugs, particularly hydrazides and related nucleophiles, prepared from the calicheamicins. These linkers are especially useful in those cases where better activity is obtained when the linkage formed between the drug and the linker is hydrolyzable. These linkers contain two functional groups, including (1) a group for reaction with an antibody (*e.g.*, carboxylic acid), and (2) a carbonyl group (*e.g.*, an aldehyde or a ketone) for reaction with a drug. The carbonyl groups may react with a hydrazide group on

the drug to form a hydrazone linkage. This linkage is hydrolyzable, allowing for release of the therapeutic agent from the conjugate after binding to the target cells.

As one example, a chimeric or humanized H8 antibody may be conjugated to a cytotoxic drug by (1) adding the cytotoxic drug derivative to the anti-5T4 antibody wherein the cytotoxic drug is 4.5 - 11% by weight of the proteinaceous carrier; (2) incubating the cytotoxic drug derivative and anti-5T4 antibody in a non-nucleophilic, protein-compatible, buffered solution having a pH in the range from about 7 to 9 to produce a monomeric cytotoxic drug/antibody conjugate, wherein the solution further comprises (a) a suitable organic cosolvent, and (b) an additive comprising at least one C_6-C_{18} carboxylic acid or its salt, and wherein the incubation is conducted at a temperature ranging from about 30°C to about 35°C for a period of time ranging from about 15 minutes to 24 hours; and (3) subjecting the conjugate produced in step (2) to a chromatographic separation process to separate monomeric conjugates with a loading in the range of 3% to 10 % by weight cytotoxic drug and with low conjugated fraction (LCF) below 10 percent from unconjugated antibody, cytotoxic drug derivative, and aggregated conjugates.

The chromatographic separation of step (3) can include processes such as size exclusion chromatography (SEC), ultrafiltration/diafiltration, HPLC, FPLC, or Sephacryl S-200 chromatography. The chromatographic separation may also be accomplished by hydrophobic interaction chromatography (HIC) using Phenyl Sepharose 6 Fast Flow chromatographic medium, Butyl Sepharose 4 Fast Flow chromatographic medium, Octyl Sepharose 4 Fast Flow chromatographic medium, Toyopearl Ether-650M chromatographic medium, Macro-Prep methyl HIC medium or Macro-Prep t-Butyl HIC medium.

Representative methods for preparing anti-H8 antibody/drug conjugates include those described for preparation of CMC-544 in co-pending published U.S. Patent Application Publication No. 2004-082764A1 and U.S. Patent Application No. 10/699,874, which are incorporated herein in their entirety. Conjugation may be performed using the following conditions: 10 mg/ml antibody, 8.5% (w/w) calicheamicin derivative, 37.5 mM sodium decanoate, 9% (v/v) ethanol, 50 mM HEPBS (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(4-butanesulfonic acid)), pH 8.5, 32°C, 1 hour. Hydrophobic interaction chromatography (HIC) may be performed using a butyl sepharose FF resin, 0.65 M potassium phosphate loading buffer, 0.49 M potassium phosphate wash buffer, and 4 mM potassium phosphate elution buffer. Buffer exchange may be accomplished by size exclusion chromatography, ultrafiltration/diafiltration, or other suitable means. The antibody/drug conjugate may be formulated in 1.5% Dextran-40, 0.9% sucrose, 0.01% TWEEN®-80, 20 mM Tris/50 mM NaCl, pH 8.0. An alternative formulation solution containing 5% sucrose, 0.01% TWEEN®-80, 20 mM Tris/10 mM NaCl, pH 8.0 may also be used. Lyophilization cycles are adjusted based on the formulation. The concentration of the formulated bulk may be 0.5 mg

conjugate/ml. Each may vial contain 1 mg of conjugate, *i.e.*, 2 ml fill. Other fill volumes may be prepared as desired, *e.g.*, 5 ml fill.

Other representative methods include those described for CMD-193, also described in co-pending U.S. Patent Application No. 11/060,587. Conjugation may be performed using the following conditions: 10 mg/ml antibody, 7% (w/w) calicheamicin derivative, 10 mM deoxycholate, 50 mM HEPBS (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(4-butanesulfonic acid)), 9% (v/v) ethanol, pH 8.2, 32°C, 1 hour. The reaction may be diluted 10-fold with 0.66 M potassium phosphate pH 8.56, and HIC may be performed using a butyl sepharose FF resin, 0.60 M potassium phosphate loading buffer and wash buffer, and 20 mM Tris/25 mM NaCl elution buffer. Buffer exchange may be accomplished using ultrafiltration/diafiltration with a regenerated cellulose membrane. The conjugate may be diafiltered against 20 mM Tris/10 mM NaCl pH 8.0 (10 diavolumes). The antibody/drug conjugate may be formulated in 5% sucrose, 0.01% TWEEN®-80, 20 mM Tris/10 mM NaCl, pH 8.0. The concentration of the bulk conjugate after formulation may be 1 mg/ml, and the vial fill may be 5 mg/vial, *i.e.*, 5 ml fill, or other fill volumes may be prepared as desired.

In a particular embodiment of the invention, the linker employed is 4-(4-acetylphenoxy) butanoic acid (AcBut). Antibody/drug conjugates are prepared by reacting β-calicheamicin, γ-calicheamicin or N-acetyl γ-calicheamicin, or derivatives thereof, with 3-mercapto-3-methyl butanoyl hydrazide, the AcBut linker, and an anti-5T4 antibody of the invention. *See e.g.*, U.S. Patent No. 5,773,001. This linker produces conjugates that are substantially stable in circulation, releasing an estimated 2% of the NAc-gamma DMH per day, and which release the NAc-gamma DMH readily in the acidic lysosomes. In other embodiments of the invention, antibody/drug conjugates are prepared using 3-acetylphenyl acidic acid (AcPac) or 4-mercapto-4-methyl-pentanoic acid (Amide) as the linker molecule. *See* Example 2.

Representative linkers useful for conjugation of radioisotopes include diethylenetriamine pentaacetate (DTPA)-isothiocyanate, succinimidyl 6-hydrazinium nicotinate hydrochloride (SHNH), and hexamethylpropylene amine oxime (HMPAO) (Bakker et al. (1990) *J. Nucl. Med.* 31: 1501-9, Chattopadhyay et al. (2001) *Nucl. Med. Biol.* 28: 741-4, Dewanjee et al. (1994) *J. Nucl. Med.* 35: 1054-63, Krenning et al. (1989) *Lancet* 1: 242-4, Sagiuchi et al. (2001) *Ann. Nucl. Med.* 15: 267-70); U.S. Patent No. 6,024,938). Alternatively, a targeting molecule may be derivatized so that a radioisotope may be bound directly to it (Yoo et al. (1997) *J. Nucl. Med.* 38: 294-300). Iodination methods are also known in the art, and representative protocols may be found, for example, in Krenning et al. (1989) *Lancet* 1:242-4 and in Bakker et al. (1990) *J. Nucl. Med.* 31:1501-9.

To further increase the number of drug molecules per antibody/drug conjugate, the drug may be conjugated to polyethylene glycol (PEG), including straight or branched

PCT/US05/32196

polyethylene glycol polymers and monomers. A PEG monomer is of the formula: $-(CH_2CH_2O)-$. Drugs and/or peptide analogs may be bound to PEG directly or indirectly, *i.e.* through appropriate spacer groups such as sugars. A PEG/antibody/drug composition may also include additional lipophilic and/or hydrophilic moieties to facilitate drug stability and delivery to a target site *in vivo*. Representative methods for preparing PEG-containing compositions may be found in U.S. Patent Nos. 6,461,603; 6,309,633; and 5,648,095, among other places.

The hydrophobic nature of many drugs, including calicheamicins, may results in aggregation of antibody/drug conjugates. To produce monomeric antibody/drug conjugates with higher drug loading/yield and decreased aggregation, the conjugation reaction may be performed in a non-nucleophilic, protein-compatible, buffered solution containing (i) propylene glycol as a cosolvent and (ii) an additive comprising at least one C_6-C_{18} carboxylic acid. Useful acids include C_7 to C_{12} acids, such as octanoic acid or caprylic acid, or its salts. Other protein-compatible organic cosolvents other than propylene glycol, such as ethylene glycol, ethanol, DMF, DMSO, etc., may also be used. Some or all of the organic cosolvent is used to transfer the drug into the conjugation mixture. Useful buffers for the preparation of antibody/drug conjugates using N-hydroxysuccinimide (OSu) esters or other comparably activated esters include phosphate-buffered saline (PBS) and N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES buffer). The buffered solution used in conjugation reactions should substantially lack free amines and nucleophiles. As another approach, the conjugation reactions may be performed in a non-nucleophilic, protein-compatible, buffered solution containing t-butanol without the additional additives. *See e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,712,374 and 5,714,586. Additional methods for conjugation and calicheamicin-containing conjugates are described in U.S. Patent Nos. 5,739,116 and 5,877,296.

Optimal reaction conditions for formation of a monomeric conjugate may be empirically determined by variation of reaction variables such as temperature, pH, calicheamicin derivative input, and additive concentration. Representative amounts of propylene glycol range from 10% to 60%, for example 10% to 40%, or about 30% by volume of the total solution. Representative amounts of an additive comprising at least one C_6-C_{18} carboxylic acid or its salt range from 20 mM to 100 mM, such as from 40 mM to 90 mM, or about 60 mM to 90 mM. The concentration of the C_6-C_{18} carboxylic acid or its salt may be increased to 150-300 mM and the cosolvent dropped to 1% to 10%. In representative embodiments of the invention, the carboxylic acid is octanoic acid, decanoic acid, or the corresponding salts. For example, 200 mM caprylic acid may be used with 5% propylene glycol or ethanol. The conjugation reaction may be performed at slightly elevated temperature (30-35°C) and pH (8.2-8.7). The concentration of antibody may range from 1 to 15 mg/ml and the concentration of a calicheamicin derivative, *e.g.*, N-Acetyl gamma-

calicheamicin DMH AcBut OSu ester may range from about 4.5% to 11% by weight of the antibody. Conditions suitable for conjugation of other drugs may be determined by those skilled in the art without undue experimentation.

II.C. Purification of Antibody/Drug Conjugates

Following conjugation, the monomeric conjugates may be separated from unconjugated reactants and/or aggregated forms of the conjugates by conventional methods, for example size exclusion chromatography (SEC), hydrophobic interaction chromatography (HIC), ion exchange chromatography (IEC), or chromatofocusing (CF). The purified conjugates are monomeric, and usually contain from 3% to 10% drug by weight. Antibody/drug conjugates may also be purified using hydrophobic interaction chromatography (HIC), which offers some advantages over SEC including (1) a capability to efficiently reduce the LCF content as well as aggregate; (2) accommodation of large reaction volumes; and (3) minimal dilution of the product. High-capacity HIC media suitable for production scale use include Phenyl Sepharose 6 Fast Flow chromatographic medium, Butyl Sepharose 4 Fast Flow chromatographic medium, Octyl Sepharose 4 Fast Flow chromatographic medium, Toyopearl Ether-650M chromatographic medium, Macro-Prep methyl HIC medium or Macro-Prep t-Butyl HIC medium. Ultrafiltration/diafiltration may also be used for buffer exchange.

In a representative purification process, multiple steps are performed, including a centrifuge cell removal step, a Protein A affinity capture step followed by one or two orthogonal chromatographic polishing steps, a virus filtration step, and a tangential-flow filtration step for concentration and formulation. The purification process preferably yields product with less than 5% aggregate, less than 20ppm Protein A, less than 50ppm host cell protein, and overall recovery of greater than 50%.

A typical humanized anti-5T4/calicheamicin preparation contains predominantly (~85%) conjugated antibody containing 5-7 moles calicheamicin per mole antibody. The conjugate has been reproducibly prepared at the laboratory scale (10-200 mg). Drug loading, which is expressed as μg calicheamicin/mg mAb, is determined by dividing the calicheamicin concentration (μg/mL) by the antibody concentration (mg/mL). These values are determined by measuring the UV absorbance of the conjugate solution at 280nm and 310nm. It is important to note that this is an average loading and that the actual loading is a quasi-gaussian distribution centered on the average loading value, *i.e.*, some of the antibody is loaded higher than average and some of the antibody is loaded lower than the average. Unconjugated antibody (low conjugated fraction), which can be measured using analytical HIC-HPLC (hydrophobic interaction high-performance liquid chromatography), is the population of antibody that has little or no conjugated calicheamicin. This value is a

measure of calicheamicin distribution on the antibody and does not generally affect the amount of calicheamicin dosed. Unconjugated calicheamicin, which can be measured using ELISA, refers to the amount of calicheamicin that is not conjugated to the antibody and is expressed in terms of percent of total calicheamicin. Drug-loading assays do not differentiate between unconjugated and conjugated calicheamicin. The amount of unconjugated calicheamicin is undetectable or negligible when using drug-loading assays, and therefore these assays effectively measure the amount of conjugated calicheamicin.

Analytical methods can be used to assay for release and stability testing of humanized anti-5T4 calicheamicin conjugates. The conjugates can be evaluated for identity (IEF), strength (total protein and total calicheamicin loading), purity (unconjugated calicheamicin, low conjugated antibody, aggregate content and SDS-PAGE Reduced), and immunoaffinity (antigen binding ELISA). Additional assays known to those of skill in the art can be used. Using these assays, batch-to-batch consistency can be maintained in commercial manufacture.

II.D. Pharmacokinetics of Antibody/Drug Conjugates

The pharmacokinetics of 5T4-targeted immunoconjugates can be evaluated and compared to the pharmacokinetics of unconjugated calicheamicin in various animals. For example, this can be done following a single intravenous bolus administration in female nude mice, male Sprague-Dawley rats, and female cynomolgus monkeys. Pharmacokinetics of an anti-5T4 antibody are generally characterized by low clearance, low volume of distribution, and long apparent terminal half-life in various species. The serum concentrations of unconjugated calicheamicin derivatives are expected to be below the quantification limit. The toxicity profile for these conjugates in single-dose toxicity ranging studies is expected to be similar to that obtained for other antibody/calicheamicin conjugates at comparable doses.

III. Uses of Chimeric and Humanized Anti-5T4 Antibodies and Antibody/Drug Conjugates

The humanized anti-5T4 antibodies and antibody/drug conjugates of the invention are useful both *in vitro* and *in vivo* for applications related to 5T4-expressing cells. As described in Example 1, 5T4-expressing cancer cells include squamous/adenomatous lung carcinoma (non-small-cell lung carcinoma), invasive breast carcinoma, colorectal carcinoma, gastric carcinoma, squamous cervical carcinoma, invasive endometrial adenocarcinoma, invasive pancreas carcinoma, ovarian carcinoma, squamous vesical carcinoma, and choriocarcinoma. 5T4 was detected at high levels on carcinomas of bronchi, breast, colon, rectum, stomach, cervix, endometrium, pancreas, ovaria, chorium, and seminal vesicles.

For *in vivo* applications, the utility of the disclosed humanized antibodies as drug carriers relies on their ability to behave as targeting molecules. The term targeting refers to the preferential movement and/or accumulation of a peptide or peptide analog in a target tissue as compared with a control tissue. The term target tissue as used herein refers to tissues comprising 5T4-expressing cells, *i.e.*, an intended site for accumulation of an antibody/drug conjugate of the invention following administration to a subject. The term control tissue as used herein refers to a site suspected to substantially lack binding and/or accumulation of an administered antibody/drug conjugate, *i.e.*, tissues that substantially lack 5T4-expressing cells. The term selective targeting is used herein to refer to a preferential localization of an antibody/drug conjugate such that an amount of antibody/drug conjugate in a target tissue is about 2-fold greater than an amount of peptide analog in a control tissue, such as an amount that is about 5-fold or greater, or about 10-fold or greater.

III.A. *In Vitro* Applications

The present invention provides *in vitro* methods using humanized anti-5T4 antibodies. For example, the disclosed antibodies may be used, either alone or in combination with cytotoxic agents or other drugs to specifically bind 5T4-positive cancer cells to deplete such cells from a cell sample.

Methods are also provided for targeted cytolysis via contacting 5T4-expressing cells with an antibody/drug conjugate comprising an anti-5T4 antibody conjugated to a cytotoxin. *See* Examples 3 and 8. Also provided are methods for inhibiting proliferation of 5T4-expressing cells and for inducing apoptosis of 5T4-expressing cells via contacting the cells with an antibody/drug conjugate comprising a cytotoxic drug. The contacting of the 5T4-expressing cells with the antibody/drug conjugate may be accomplished *in vitro* or *in vivo*.

III.B. Diagnostic and Detection Methods

Humanized anti-5T4 antibodies of the invention also have utility in the detection of 5T4+ cells *in vitro* and *in vivo* based on their ability to specifically bind the 5T4 antigen. A method for detecting 5T4-expressing cells may comprise: (a) preparing a biological sample comprising cells; (b) contacting a humanized anti-5T4 antibody with the biological sample *in vitro*, wherein the antibody comprises a detectable label; and (c) detecting the detectable label, whereby 5T4-expressing cells are detected.

The disclosed detection methods may also be performed *in vivo*, for example as useful for diagnosis, to provide intraoperative assistance, or for dose determination. Following administration of a labeled humanized anti-5T4 antibody to a subject, and after a time sufficient for binding, the biodistribution of 5T4-expressing cells bound by the antibody may be visualized. The disclosed diagnostic methods may be used in combination with

treatment methods. In addition, humanized anti-5T4 antibodies of the invention may be administered for the dual purpose of detection and therapy.

Representative non-invasive detection methods include scintigraphy (*e.g.*, SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography), PET (Positron Emission Tomography), gamma camera imaging, and rectilinear scanning), magnetic resonance imaging (*e.g.*, convention magnetic resonance imaging, magnetization transfer imaging (MTI), proton magnetic resonance spectroscopy (MRS), diffusion-weighted imaging (DWI) and functional MR imaging (fMRI)), and ultrasound.

III.C. Therapeutic Applications

The present invention further relates to methods and compositions useful for inducing cytolysis of 5T4-expressing cancer cells in a subject. Thus, the disclosed methods are useful for inhibiting cancer growth, including delayed tumor growth and inhibition of metastasis. While not intending to be bound by any single mode of operation, both antigen-guided targeting (*see e.g.*, Examples 3, 4, and 9) as well as passive targeting (*see e.g.*, Example 10) of humanized H8-calicheamicin conjugates may contribute to anti-tumor efficacy.

Representative cancers treatable using the disclosed anti-5T4 antibodies and antibody/drug conjugates include 5T4-expressing primary and metastatic tumors in breast, colon, rectum, lung, oropharynx, hypopharynx, esophagus, stomach, pancreas, liver, gallbladder, bile ducts, small intestine, urinary tract including kidney, bladder and urothelium, female genital tract, cervix, uterus, ovaries, male genital tract, prostate, seminal vesicles, testes, an endocrine gland, thyroid gland, adrenal gland, pituitary gland, skin, bone, soft tissues, blood vessels, brain, nerves, eyes, meninges. In particular, the disclosed anti-5T4 antibody/drug conjugates of the invention may be used for the treatment of non-small cell lung cancer, metastatic breast cancer, and pancreatic cancer as both second-line monotherapy and as part of first-line combination therapy. Target cancers may also express the Lewis Y carbohydrate antigen, including breast, colon, gastric, esophageal, pancreatic, duodenal, lung, bladder and renal carcinomas and gastric and islet cell neuroendocrine tumors. *See* U.S. Patent No. 6,310,185.

The disclosed methods also pertain to 5T4-expressing leukemia and lymphoma cells, including Hodgkin's lymphoma cells and non-Hodgkin's lymphoma cells. The lymphoma cells may be lymphoma cells indolent, aggressive, low-grade, intermediate-grade, or high-grade.

Thus, patients to be treated with the humanized anti-5T4 antibody/calicheamicin conjugates of the invention may be selected based on biomarker expression, including but not limited to elevated expression of 5T4 antigen, resulting in a patient population selected

PCT/US05/32196

for enriched target expression rather than tumor origin or histology. Target expression can be measured as a function of the number of cells staining combined with the intensity of the cells staining. For example, classification of high expression of 5T4 includes those patients with greater than 30% (*i.e.*, 40%, 50% or 60%) of the cells tested by immunohistochemical staining positive for 5T4 at a level of 3+ (on a scale of 1 to 4), while moderate expression of the 5T4 can include those patients with greater than 20% of the cell cells staining at 1+ to 2+.

Biomarkers other than expression of 5T4 antigen can be also used for patient selection, including characterization of the tumor based on multi-drug resistance (MDR), for example. Nearly 50 per cent of human cancers are either completely resistant to chemotherapy or respond only transiently, after which they are no longer affected by commonly used anticancer drugs. This phenomenon is referred to as MDR and is inherently expressed by some tumor types, while others acquire MDR after exposure to chemotherapy treatment. The drug efflux pump P-glycoprotein mediates a majority of the MDR associated with cytotoxic chemotherapeutics. Phenotypic and functional analysis of MDR mechanisms present in cancer patient tumor specimens can be conducted in order to relate specific MDR mechanism(s) with resistance to chemotherapy in specific tumor types.

The term cancer, as used herein, also encompasses non-neoplastic proliferative disorders. Thus, the methods of the present invention are contemplated for the treatment or prevention of hyperplasia, metaplasia, or most particularly, dysplasia (for review of such abnormal growth conditions, *see* DeVita, Jr. et a. (2001), Cancer: Principles and Practice, 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins.

The term cancer growth generally refers to any one of a number of indices that suggest change within the cancer to a more developed form. Thus, indices for measuring an inhibition of cancer growth include but are not limited to a decrease in cancer cell survival, a decrease in tumor volume or morphology (for example, as determined using computed tomographic (CT), sonography, or other imaging method), a delayed tumor growth, a destruction of tumor vasculature, improved performance in delayed hypersensitivity skin test, an increase in the activity of cytolytic T-lymphocytes, and a decrease in levels of tumor-specific antigens. The term delayed tumor growth refers to a decrease in duration of time required for a tumor to grow a specified amount. For example, treatment may delay the time required for a tumor to increase in volume 3-fold relative to an initial day of measurement (day 0) or the time required to grow to 1 cm^3.

III.D. Formulation

Chimeric and humanized anti-5T4 antibodies of the invention are readily prepared and formulated for safe and efficacious clinical use. Suitable formulations for administration

PCT/US05/32196

to a subject include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats, antibacterial and antifungal agents (*e.g.*, parabens, chlorobutanol, phenol, ascorbic acid, and thimerosal), solutes that render the formulation isotonic with the bodily fluids of the intended recipient (*e.g.*, sugars, salts, and polyalcohols), suspending agents and thickening agents. Suitable solvents include water, ethanol, polyol (*e.g.*, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol), and mixtures thereof. The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example sealed ampoules and vials, and may be stored in a frozen or freeze-dried (lyophilized) condition requiring only the addition of sterile liquid carrier immediately prior to use for administration to a subject or for subsequent radiolabeling with an isotope appropriate for the intended application. Anti-5T4 antibodies and antibody/drug conjugates of the invention are preferably formulated as an effective dose, described below.

As one example, a representative anti-5T4 antibody formulation comprises a multi-dose formulation of 40 mg/ml antibody or antibody/drug conjugate, 25 mM acetate, 150 mM trehalose, 0.9% benzyl alcohol, 0.02% polysorbate 20 at pH 5.0, and which has a minimum shelf life of two years storage at 2-8°C. As another example, an anti-5T4 antibody formulation may comprise 10 mg/ml antibody or antibody/drug conjugate in 9.0 mg/ml sodium chloride, 7.35 mg/ml sodium citrate dihydrate, 0.7 mg/ml polysorbate 80, and sterile water, pH 6.5. Representative formulations of an anti-5T4/calicheamicin conjugate for administration to experimental mouse models include 2 μg or 4 μg calicheamicin (*see* Examples 3, 4, and 7), which may be scaled accordingly for administration to humans.

A stable lyophilized formulation of an anti-5T4 antibody or antibody/drug conjugate may be prepared by (a) dissolving an antibody/drug conjugate to a final concentration of 0.5 to 2 mg/ml in a solution comprising a cryoprotectant at a concentration of 1.5%-5% by weight, a polymeric bulking agent at a concentration of 0.5-1.5% by weight, electrolytes at a concentration 0.01 M to 0.1 M, a solubility facilitating agent at a concentration of 0.005% to 0.05% by weight, buffering agent at a concentration of 5-50 mM such that the final pH of the solution is 7.8-8.2, and water; (b) dispensing the above solution into vials at a temperature of +5°C to +10°C; (c) freezing the solution at a freezing temperature of -35°C to -50°C; (d) subjecting the frozen solution to an initial freeze drying step at a primary drying pressure of 20 to 80 microns at a shelf temperature at -10°C to -40°C for 24 to 78 hours; and (e) subjecting the freeze-dried product of step (d) to a secondary drying step at a drying pressure of 20 to 80 microns at a shelf temperature of +10°C to + 35°C for 15 to 30 hours.

Representative cryoprotectants useful for lyophilization of the cryoprotectant include alditol, mannitol, sorbitol, inositol, polyethylene glycol, aldonic acid, uronic acid, aldaric acid, aldoses, ketoses, amino sugars, alditols, inositols, glyceraldehydes, arabinose, lyxose,...

PCT/US05/32196

pentose, ribose, xylose, galactose, glucose, hexose, idose, mannose, talose, heptose, glucose, fructose, gluconic acid, sorbitol, lactose, mannitol, methyl α-glucopyranoside, maltose, isoascorbic acid, ascorbic acid, lactone, sorbose, glucaric acid, erythrose, threose, arabinose, allose, altrose, gulose, idose, talose, erythrulose, ribulose, xylulose, psicose, tagatose, glucuronic acid, gluconic acid, glucaric acid, galacturonic acid, mannuronic acid, glucosamine, galactosamine, sucrose, trehalose, neuraminic acid, arabinans, fructans, fucans, galactans, galacturonans, glucans, mannans, xylans, levan, fucoidan, carrageenan, galactocarolose, pectins, pectic acids, amylose, pullulan, glycogen, amylopectin, cellulose, dextran, pustulan, chitin, agarose, keratin, chondroitin, dermatan, hyaluronic acid, alginic acid, xanthan gum, starch, sucrose, glucose, lactose, trehalose, ethylene glycol, polyethylene glycol, polypropylene glycol, glycerol and pentaerythritol.

For example, the cryoprotectant sucrose may be used at a concentration of 1.5% by weight, the polymeric bulking agent Dextran 40 or hydroxyethyl starch 40 may be used at a concentration of 0.9% by weight, the electrolyte used in the lyophilization solution is sodium chloride, which is present at a concentration of 0.05 M, and the buffering agent tromethamine may be used at a concentration of 0.02 M. A solubility facilitating agent (*e.g.*, a surfactant such as Polysorbate 80) may also be used during the lyophilization process. Usually this solubility facilitating agent is a surfactant. Representative steps for preparation of a lyophilized formulation include freezing the vials at a temperature of -45 °C; the frozen solution is subjected to an initial freeze drying step at a primary drying pressure of 60 microns and at a shelf temperature of -30°C for 60 hours; and subjecting the freeze-dried product to a secondary drying step at a drying pressure of 60 microns at a shelf temperature of +25°C for 24 hours.

Anti-5T4 antibodies and antibody/drug conjugates are formulated in a pharmaceutically acceptable carrier, for example, large slowly metabolized macromolecules such as proteins, polypeptides, liposomes, polysaccharides, polylactic acids, polyglycolic acids, polymeric amino acids, amino acid copolymers and inactive virus particles. Pharmaceutically acceptable salts may also be used, for example, mineral acid salts, such as hydrochlorides, hydrobromides, phosphates and sulfates, or salts of organic acids, such as acetates, propionates, malonates and benzoates. Formulations may additionally contain liquids such as water, saline, glycerol, and ethanol, and/or auxiliary substances, such as wetting or emulsifying agents or pH buffering substances, may be present in such compositions. Such carriers enable the compositions to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries and suspensions, for ingestion by the patient.

III.E. Dose and Administration

A humanized anti-5T4 antibody may be administered parenterally, for example, via intravascular, subcutaneous, intraperitoneal, or intramuscular administration. For delivery of compositions to pulmonary pathways, compositions may be administered as an aerosol or coarse spray, *i.e.* transnasal administration. Intrathecal or intramedullary administration may be used for treatment of central nervous system (CNS) and CNS-related cancers. An anti-5T4 antibody of the invention may also be administered transdermally, transcutaneously, topically, enterally, intravaginally, sublingually or rectally. A delivery method is selected based on considerations such as the condition and site to be treated, the type of antibody formulation, and the therapeutic efficacy of the composition. Intravenous administration may be routinely used in the clinic.

The present invention provides that an effective amount of a humanized anti-5T4 antibody is administered to a subject. The term effective amount is used herein to describe an amount of a humanized anti-5T4 antibody sufficient to elicit a desired biological response. For example, when administered to a cancer-bearing subject, an effective amount comprises an amount sufficient to elicit an anti-cancer activity, including cancer cell cytolysis, inhibition of cancer cell proliferation, induction of cancer cell apoptosis, reduction of cancer cell antigens, delayed tumor growth, and inhibition of metastasis. Tumor shrinkage is well accepted as a clinical surrogate marker for efficacy. Another well accepted marker for efficacy is progression-free survival. Anti-5T4/calicheamicin conjugates generally demonstrate at least a 25% improvement in key efficacy parameters, such as improvement in median survival, time to tumor progression, and overall response rate.

Generally, an effective dose is in the range from about 0.01 mg/m^2 to about 50 mg/m^2, such as from about 0.1 mg/m^2 to about 20 mg/m^2, or about 15 mg/m^2, which dose is calculated based on the amount of anti-5T4 antibody or based upon the amount of calicheamicin in the antibody/calicheamicin preparation. Representative doses of an anti-5T4/calicheamicin conjugate for administration to experimental mouse models include 2 μg or 4 μg calicheamicin (*see* Examples 3-4 and 9), which may be scaled accordingly for administration to humans. For example, anti-5T4/calicheamicin conjugates of the invention may be administered to human patients once every 3 weeks for up to 6 cycles. For a radiolabeled anti-5T4 antibody, an effective dose is typically in the range from about 1 mCi to about 300 mCi, normally about 5 mCi to 100 mCi, depending on the radioisotope and the binding affinity of the antibody.

For detection of 5T4-positive cells using the disclosed chimeric and humanized anti-5T4 antibodies, a detectable amount of a composition of the invention is administered to a subject. A detectable amount, as used herein to refer to a diagnostic composition, refers to

a dose of a chimeric or humanized H8 antibody such that the presence of the antibody may be determined *in vitro* or *in vivo*. For scintigraphic imaging using radioisotopes, typical doses of a radioisotope may include an activity of about 10 µCi to 50 mCi, or about 100 µCi to 25 mCi, or about 500 µCi to 20 mCi, or about 1 mCi to 10 mCi, or about 10 mCi.

Actual dosage levels of active ingredients in a composition of the invention may be varied so as to administer an amount of the composition that is effective to achieve the desired diagnostic or therapeutic outcome. Administration regimens may also be varied. A single injection or multiple injections may be used. The selected dosage level and regimen will depend upon a variety of factors including the activity and stability (*i.e.*, half life) of the therapeutic composition, formulation, the route of administration, combination with other drugs or treatments, the disease or disorder to be detected and/or treated, and the physical condition and prior medical history of the subject being treated.

For any anti-5T4 or antibody/drug conjugate of the invention, the therapeutically effective dose may be estimated initially either in cell culture assays or in animal models, usually in rodents, rabbits, dogs, pigs, and/or or primates. The animal model may also be used to determine the appropriate concentration range and route of administration. Such information may then be used to determine useful doses and routes for administration in humans. Typically a minimal dose is administered, and the dose is escalated in the absence of dose-limiting cytotoxicity. Determination and adjustment of an effective amount or dose, as well as evaluation of when and how to make such adjustments, are known to those of ordinary skill in the art of medicine.

For additional guidance regarding formulation, dose, administration regimen, and measurable therapeutic outcomes, see Berkow et al. (2000) The Merck Manual of Medical Information, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey; Ebadi (1998) CRC Desk Reference of Clinical Pharmacology, CRC Press, Boca Raton, Florida; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania; Katzung (2001) Basic & Clinical Pharmacology, Lange Medical Books / McGraw-Hill Medical Pub. Div., New York; Hardman et al. (2001) Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, The McGraw-Hill Companies, Columbus, Ohio; Speight & Holford (1997) Avery's Drug Treatment: A Guide to the Properties, Choices, Therapeutic Use and Economic Value of Drugs in Disease Management, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania.

III.F. Combination Therapies

The disclosed anti-5T4 antibodies may be administered as an initial treatment, or for treatment of conditions that are unresponsive to conventional therapies. In addition, the disclosed anti-5T4 antibodies may be used in combination with other therapies (*e.g.*, surgical

excision, radiation, additional targeted anti-cancer drugs or systemic anti-cancer drugs, *etc.*) to thereby elicit additive or potentiated therapeutic effects and/or reduce hepatocytotoxicity of some anti-cancer agents. Chimeric and humanized anti-5T4 antibodies of the invention may be co-administered or co-formulated with additional agents, or formulated for consecutive administration in either order.

Representative agents useful for combination therapy include any of the drugs described herein above as useful for preparation of anti-5T4/drug conjugates. Chimeric and humanized anti-5T4 antibodies of the invention may also be used in combination with other therapeutic antibodies and antibody/drug conjugates, including anti-5T4 antibodies other than the disclosed humanized anti-5T4 antibodies, as well as anti-CD19, anti-CD20 (*e.g.*, RITUXAN®, ZEVALIN®, BEXXAR®), anti-CD22 antibodies, anti-CD33 antibodies (*e.g.*, MYLOTARG®), anti-CD33 antibody/drug conjugates, anti-Lewis Y antibodies (*e.g.*, Hu3S193, Mthu3S193, AGmthu3S193), anti-HER-2 antibodies (*e.g.*, HERCEPTIN® (trastuzumab), MDX-210, OMNITARG® (pertuzumab, rhuMAb 2C4)), anti-CD52 antibodies (*e.g.*, CAMPATH®), anti-EGFR antibodies (*e.g.*, ERBITUX® (cetuximab), ABX-EGF (panitumumab)), anti-VEGF antibodies (*e.g.*, AVASTIN® (bevacizumab)); anti-DNA/histone complex antibodies (*e.g.*, ch-TNT-1/b), anti-CEA antibodies (*e.g.*, CEA-Cide, YMB-1003) hLM609, anti-CD47 antibodies (*e.g.*, 6H9), anti-VEGFR2 (or kinase insert domain-containing receptor, KDR) antibodies (*e.g.*, IMC-1C11), anti-Ep-CAM antibodies (*e.g.*, ING-1), anti-FAP antibodies (*e.g.*, sibrotuzumab), anti-DR4 antibodies (*e.g.*, TRAIL-R), anti-progesterone receptor antibodies (*e.g.*, 2C5), anti-CA19.9 antibodies (*e.g.*, GIVAREX®) and anti-fibrin antibodies (*e.g.*, MH-1).

Anti-5T4 antibody/drug conjugates may also be administered together with one or more combinations of cytotoxic agents as part of a treatment regimen. Useful cytotoxic preparations for this purpose include CHOPP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone and procarbazine); CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone); COP (cyclophosphamide, vincristine, prednisone); CAP-BOP (cyclophosphamide, doxorubicin, procarbazine, bleomycin, vincristine and prednisone); m-BACOD (methotrexate, bleomycin, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, dexamethasone, and leucovorin; ProMACE-MOPP (prednisone, methotrexate, doxorubicin, cyclophosphamide, etoposide, leukovorin, mechlorethamine, vincristine, prednisone and procarbazine); ProMACE-CytaBOM (prednisone, methotrexate, doxorubicin, cyclophosphamide, etoposide, leukovorin, cytarabine, bleomycin and vincristine); MACOP-B (methotrexate, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, prednisone, bleomycin and leukovorin); MOPP (mechlorethamine, vincristine, prednisone and procarbazine); ABVD (adriamycin/doxorubicin, bleomycin, vinblastine and dacarbazine); MOPP (mechlorethamine, vincristine, prednisone and procarbazine) alternating with ABV (adriamycin/doxorubicin,

bleomycin, vinblastine); MOPP (mechloethamine, vincristine, prednisone and procarbazin) alternating with ABVD(adriamycin/doxorubicin, bleomycin, vinblastine and dacarbazine); ChlVPP (chlorambucil, vinblastine, procarbazine, prednisone); IMVP-16 (ifosfamide, methotrexate, etoposide); MIME (methyl-gag, ifosfamide, methotrexate, etoposide); DHAP (dexamethasone, high-dose cytarbine and cisplatin); ESHAP (etoposide, methylprednisolone, HD cytarabine, and cisplatin); CEPP(B) (cyclophosphamide, etoposide, procarbazine, prednisone and bleomycin); CAMP (lomustine, mitoxantrone, cytarabine and prednisone); and CVP-1 (cyclophosphamide, vincristine and prednisone); DHAP (cisplatin, high-dose cytarabine and dexamethasone); CAP (cyclophosphamide, doxorubicin, cisplatin); PV (cisplatin, vinblastine or vindesine); CE (carboplatin, etoposide); EP (etoposide, cisplatin); MVP (mitomycin, vinblastine or vindesine, cisplatin); PFL (cisplatin, 5-flurouracil, leucovorin); IM (ifosfamide, mitomycin); IE (ifosfamide, etoposide); IP (ifosfamide, cisplatin); MIP (mitomycin, ifosfamide, cisplatin); ICE (ifosfamide, carboplatin, etoposide); PIE (cisplatin, ifosfamide, etoposide); Vioreibine and cisplatin; Carboplatin and paclitaxel; CAV (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine); CAE (cyclophosphamide, doxorubicin, etoposide); CAVE (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, etoposide); EP (etoposide, cisplatin); and CMCcV (cyclophosphamide, methotrexate, lomustine, vincristine).

Anti-5T4/calicheamicin conjugates may be used in combination with systemic anti-cancer drugs, such as epithilones (BMS-247550, Epo-906), reformulations of taxanes (Abraxane, Xyotax), microtubulin inhibitors (MST-997, TTI-237), or with targeted cytotoxins such as CMD-193 and SGN-15. Additional useful anti-cancer agents include TAXOTERE®, TARCEVA®, GEMZAR® (gemcitabine), 5-FU, AVASTIN®, ERBITUX®, TROVAX®, anatumomab mafenatox, letrazole, docetaxel, and anthracyclines.

For combination therapies, a humanized anti-5T4 antibody and additional therapeutic or diagnostic agents are administered within any time frame suitable for performance of the intended therapy or diagnosis. Thus, the single agents may be administered substantially simultaneously (*i.e.*, as a single formulation or within minutes or hours) or consecutively in any order. For example, single agent treatments may be administered within about 1 year of each other, such as within about 10, 8, 6, 4, or 2 months, or within 4, 3, 2 or 1 week(s), or within about 5, 4, 3, 2 or 1 day(s). The administration of the anti-5T4/calicheamicin conjugate and the second therapeutic agent preferably elicits a greater effect than administration of either alone.

EXAMPLES

The following examples have been included to illustrate modes of the invention. Certain aspects of the following examples are described in terms of techniques and procedures found or contemplated by the present co-inventors to work well in the practice of

the invention. These examples illustrate standard laboratory practices of the co-inventors. In light of the present disclosure and the general level of skill in the art, those of skill will appreciate that the following examples are intended to be exemplary only and that numerous changes, modifications, and alterations may be employed without departing from the scope of the invention.

EXAMPLE 1

5T4 Expression in Normal and Malignant Tissues

To consider 5T4 antigen as a target for cancer therapy, the distribution of 5T4 on normal and malignant tissues was determined. 5T4 was observed at high levels on the surface of various tumor cells, in some cases correlating with progression of the disease, and was substantially absent from most normal cells. This expression profile suggested 5T4 as a plausible target for cancer immunotherapy.

The expression of 5T4 in normal and cancerous tissues was assayed using the murine H8 anti-5T4 antibody according to standard techniques such as Western blot. Affinity of various antibodies and conjugates for 5T4 was verified by plasmon resonance or FACS analysis. H8 is a hybridoma generated monoclonal mouse IgG1 antibody which is described in PCT International Publication No. WO 96/55607 and in Forsberg et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(19):124430-12436. For use as a positive control in *in vitro* and *in vivo* assays, tumor cells that express reproducibly high levels of 5T4 were established by transfecting a vector expressing 5T4 into CT26 mouse colon carcinoma and MDAMB435 human breast carcinoma cells. *See* Figure 1 and Table 1.

Tumor samples tested included squamous/adenomatous lung carcinoma (non-small-cell lung carcinoma), invasive breast carcinoma, colorectal carcinoma, gastric carcinoma, squamous cervical carcinoma, invasive endometrial adenocarcinoma, invasive pancreas carcinoma, ovarian carcinoma, squamous vesical carcinoma, and choriocarcinoma. 5T4 was detected at high levels on carcinomas of bronchi, breast, colon, rectum, stomach, cervix, endometrium, pancreas, ovaria, chorium and seminal vesicles. The cell surface distribution of the 5T4 antigen (*e.g.*, homogeneous or heterogeneous) varied according to tumor type.

To assay cellular localization of the 5T4 antigen, 5T4-expressing cells were cultured as monolayers and then exposed to biotinylated murine H8 antibody. Following cell lysis, membrane-bound 5T4 antigen was separated by avidin binding, and intracellular 5T4 was detected in the non-avidin binding fraction. *See* Figure 2.

To quantify the percentage of 5T4 antigen present on the cell surface, extracts of biotinylated and control cultures of CT26/5T4 were mixed with avidin-coated beads.

Western blot analysis was performed on proteins in the supernatant, and the amount of 5T4 was estimated by densitometry. *See* Figures 3A-3B. Based on the equations of the linear regression lines determined by the dilution of the sample and the optical density of the H8-reactive band, the amount of 5T4 on the cell membrane (5T4M) was calculated using the formula: 100*(1-internal optical density / total optical density). 5T4M was calculated for three cell types: CT26/5T4, 24%; PC3-MM2, 15%, N87, 41%.

Membrane localization of 5T4 on DLD-1 cells (human colon carcinoma cells), N87 cells (human gastric carcinoma cells), PC3-MM2 cells (human prostrate carcinoma cells), and PC3 cells (human prostrate carcinoma cells) was determined by Western blot analysis following avidin depletion of biotinylated cell cultures. *See* Figure 4. Membrane localization of 5T4 on MDAMB435/5T4 cells (human breast cancer cells) was determined by FACS analysis. *See* Figures 5A-5B. Membrane localization of 5T4 on N87, PC14PE6, and NCI-H157 cells was determined by FACS analysis. *See* Figure 6. Membrane localization of 5T4 antigen on PC3-MM2 cells was also determined by histochemical detection in tissue samples.

To assess whether the H8 antibody is internalized following binding to 5T4 antigen, the amount of antibody detected at the cell surface was determined over a period of several hours. The disappearance of H8 from the surface of CT26/5T4 cells demonstrates internalization of the 5T4/H8 complex. *See* Figure 7.

Table 1 summarizes 5T4 expression in tumor cells. In colorectal carcinoma, gastric carcinoma, and ovarian carcinoma, expression of 5T4 is directly related to progression of the disease. In breast carcinoma, increased intensity of 5T4 staining on metastatic nodules was observed. However, no correlation was found between 5T4 expression in primary tumors and the stage of the disease. *See* Table 2.

Table 1

5T4 Expression in Tumor Cells

Cell line	Carcinoma	5T4 Expression	Presence of 5T4 on cell membrane	
		Western blot	Western blot + biotinylation	FACS
DLD-1	colon	2/2[a]	1/1	10[b]
GEO	colon	0/2	n.d	4.0
HCT116	colon	1/1	n.d	2.2
HT29	colon	2/2	0/1	2 7
LOVO	colon	0/2	0/1	3.3
HCA7	colon	1/1	n.d.	8.0
MDAMB361	breast	3/3	2/2	38.0, 38.0, 34 0
MDAMB435	breast *(melanoma?)*	0/2	n d	2.4
PC3	prostate	4/4	1/1	3.0
PC3MM2	prostate	6/6	2/2	11 0, 14.0
H157	lung (NSCLC)	n d	1/1	36.3, 41.8
PC14	lung (NSCLC)	1/1	n.d.	3.5
PC14/PE6	lung (NSCLC)	1/1	n.d.	3.6
N87	gastric	4/4	3/3	7 6
JAR	chorion	2/2	1/1	9.0
JEG	chorion	2/2	1/1	2.3
LOX	melanoma	2/2	0/1	0.2, 0 9
A431	cervix	3/3	1/2	2.3, 2.3
BXPC3	pancreas	1/1	n.d.	3.9

[a] = fraction of 5T4-positive cultures

[b] = relative mean channel fluorescence = MCF following staining with H8 / MCF following staining with mIgG

Table 2

5T4 Expression in Breast Carcinoma

	neoplasia		primary anaplasia			metastatic
	benign fibrocystic	benign fibroadenoma	grade 1	grade 2	grade 3	metastatic CA
Expression	67% (6/9)	80% (4/5)	75% (3/4)	100% (4/4)	89% (8/9)	100% (19/19)
Homogeneity						
100%	33% (3/9)	60% (3/5)	75% (3/4)	75% (3/4)	78% (7/9)	68% (13/19)
90%	33% (3/9)	0%	0%	0%	0	32% (6/19)
75%		0%	0%	0%	11% (1/9)	
50%		20% (1/5)	0%	25% (1/4)	0%	
25%		0%	0%	0%	0%	
0%	33% (3/9)	20% (1/5)	25% (1/4)	0%	11% (1/9)	0%
Intensity						
4 +	0%	0%	0%	0%	0%	0%
3 +	11% (1/9)	0%	0%	25% (1/4)	22% (2/9)	47% (9/19)
2 +	56% (5/9)	0%	25% (1/4)	75% (3/4)		37% (7/19*)
1 +		80% (4/5)	50% (2/4)		67% (6/9)	16% (3/19)

* = 4/19 = 1-2 +

Example 2

Preparation and Characterization of

Anti-5T4 – Calicheamicin (CM) Conjugates

The murine H8 antibody was used for preparation of antibody/drug conjugates. The conjugates were then tested *in vitro* for ability to bind human 5T4 antigen and to induce cytolysis of cancer cells. Three linkers were used to ligate calicheamicin to H8: 4-(4'-acetylphenoxy)butanoic acid (AcBut), 3-acetylphenyl acidic acid (AcPac) and 4-mercapto-4-methyl-pentanoic acid (Amide). To increase the amount of calicheamicin in H8-calicheamicin conjugates, the antibody was conjugated to PEG prior to conjugation with calicheamicin, for example, using PEG-SPA, PEG-SBA, and PEG-bis-maleimide. In Table 4, the efficiency of each of the H8-calicheamicin conjugates is reported as ED50, which is the amount of calicheamicin given as conjugate or as free drug that caused 50% reduction of a cell culture relative to an untreated control. The number of cells was determined using a vital dye (MTS).

Direct linkage of calicheamicin to H8 via the AcBut (4-(4'-acetylphenoxy)butanoic acid) acid-hydrolyzable linker proved difficult and generated mostly aggregated conjugate and conjugate with low amounts of CM per antibody (approximately 1 mole/mole). The low level of conjugation and aggregation properties of the resultant complexes rendered these complexes unsuitable for use.

Linkage of calicheamicin to H8 via a stable amide linker (4-mercapto-4-methyl-pentanoic acid) resulted in a conjugate that was 200-fold more cytotoxic against a 5T4 expressing carcinoma when compared to its 5T4-negative counterpart. *See* Figure 8 and Table 4. Despite this selectivity, the conjugate was less cytotoxic than free calicheamicin and was unable to completely destroy the cell culture at concentrations of 500 ng calicheamicin per ml of medium.

Conjugates prepared using polyethylene glycol (PEG), H8, calicheamicin, and the AcBut linker did not form aggregates and had a loading of approximately 6 mole calicheamicin per mole H8. Multiple types of PEG tested reduced the binding of H8 to 5T4 by 50% to 90%. *See* Table 3.

Table 3

Binding Activity of H8 Antibody/PEG

Name	MW (kDa)	Binding of H8PEG*	
		BIACORE®	FACS
PEG-SPA (PEG2K)	2	69%	64%
PEG-SBA (PEG5K)	5.3	79%	79%
PEG-bis-maleimide (PEGmal2)	3.4	43%	not determined

* fraction of binding to 5T4 lost following antibody modification

Despite reduced binding, two H8PEG-AcBut-CalichDMH conjugates, H8PEG2K-AcBut-CalichDMH and H8PEGmal2-AcBut-CalichDMH, proved selectively efficacious for inducing cytolysis of 5T4-expressing cells *in vitro*. Selective cytotoxicity was observed for H8-calicheamicin conjugates that retained only about 30% of binding activity. H8PEG2K-AcBut-CalichDMH was also more cytotoxic than free calicheamicin and completely destroyed the cell culture at concentrations of 500 ng calicheamicin per ml of medium. *See* Figures 9A-9B and Table 4.

Table 4

Selective Cytolysis of 5T4-Expressing Cells by H8-Calicheamicin Conjugates

Treatment				Cell lines					
				MDAMB435		MDAMB435/neo		MDAMB435/5T4	
name	antibody	PEG	linker	ED_{50} (ng/ml)	range (ng/ml)	ED_{50} (ng/ml)	range (ng-ml)	ED_{50} (ng/ml)	range (ng-ml)
CM	none	none	none	3 80 (4)[a]	0 70-7 00	11 90 (7)	2 00-30 00	10.50 (6)	5 00-20 00
CMA	p67 6	none	AcBut	41 00 (3)	23 00-70 00	50.00 (5)	20 00-90 00	55 00 (4)	20 00-80 00
H8-CM	H8	none	AcBut	3 00 (1)	3.00-3 00	2.30 (1)	2 30-2.30	0.04 (1)	0 04-0 04
H8-CM	H8	none	AcPac	n.d.	n.d.	1 00 (1)	1 00-1.00	0.02 (1)	0 02-0 02
H8^CM	H8	none	Amide	n.d	n.d.	40.00 (1)	40 00-40.00	0.18 (1)	0 18-0 18
H8PEG2K CM	H8	PEG2K	AcBut	31 00 (2)	12.00-50 00	41.50 (2)	23 00-60 00	2.60 (2)	2.00-3 20
H8PEG5K-CM	H8	PEG5K	AcBut	36 00 (2)	22 00-50 00	45 00 (2)	40 00-50 00	31.50 (2)	30 00-33 00
H8PEGmal2-CM	H8	PEGmal2	AcBut	n.d.	n.d	7 00 (1)	7.00-7 00	0 90 (1)	0 90-0 90

Numbers in parentheses indicate the number of experiments

Example 3

Anti-Tumor Efficacy of H8-Calicheamicin Conjugates

Using Subcutaneous Xenografts

To assess the cytotoxicity of H8-calicheamicin conjugates *in vivo*, tumors were prepared in nude mice by subcutaneous injection of MDAMB435/5T4 cells (human breast carcinoma cells overexpressing human 5T4 antigen), NCI-H157 cells (human non-small cell lung cancer cells), PC14PE6 cells (human non-small cell lung cancer cells), or N87 cells (human gastric carcinoma cells). H8-calicheamicin conjugates and control compounds were administered by intraperitoneal injection to tumor-bearing mice in a total of 3 doses given at 4-day intervals, *i.e.*, on days 1, 5, and 9. H8-calicheamicin conjugates inhibited growth of all tumor types. *See* Figures 10, 11A-11B, 12, 13A-13B, and 14.

Example 4

Anti-Tumor Efficacy of H8-Calicheamicin Conjugates

Using an Orthotopic Model of Human Lung Cancer

To further assess the targeting ability of antibodies having an H8-calicheamicin conjugates, an orthotopic model for non-small cell and small cell cancer was used, essentially as described by Onn et al. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9(15):5532-5539. In brief, human lung adenocarcinoma (PC14PE6) cells were injected into tail veins of nude mice, which then migrated to form tumors in lung. Tumors appeared as solid nodules in the lung parenchyma and caused hemorrhagic pleural effusions containing suspended tumor cells. *See* Figures 15A-15G. Injection of control compounds and H8-calicheamicin conjugates were administered by intraperitoneal injection to tumor-bearing mice beginning at 6 days after injection of tumor cells for a total of 3 doses given at 4-day intervals, *i.e.*, on days 6, 10, and 14. Administration of H8-calicheamicin conjugates resulted in increased survival of tumor-bearing animals. *See* Figure 16. Administration of unconjugated H8 antibody or the control conjugate CMA did not reduce the pleural effusions. However, CMS slightly increased the average survival of the tumor-bearing mice. *See* Figure 17.

Example 5

Preparation and Characterization of Humanized Anti-5T4 Antibodies

Chimeric and humanized anti-5T4 antibodies were prepared using sequences derived from the murine H8 antibody and human antibody sequences. The sequences of representative antibodies of the invention are shown in Figures 27A-27F.

Chimeric H8 antibodies were constructed having murine H8 heavy chain and light chain variable regions sequences and human constant regions sequences (Figures 27A-27B). Representative human constant regions that were used to prepare chimeric and humanized H8 antibodies include those of human IgG1, human kappa, and human IgG4. Mutations were optionally introduced to alter constant region effector functions, such as cellular dependent cytotoxicity (CDC), complement lysis, and antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC). *See* Figures 26A-26B. For cloning of sequences encoding IgG constant regions, intronic sequences may optionally be deleted. *See* Example 6. Antibodies were also prepared wherein one antibody chain comprises the murine H8 variable region (as in a chimeric antibody) and the other antibody chain comprises a humanized H8 variable region, *i.e.*, a semi-humanized antibody (Figure 27C).

Humanized H8 variable regions were constructed to include the CDRs of murine H8 grafted onto human or substantially human framework regions. The CDRs of the murine H8 antibody were identified using the AbM definition, which is based on sequence variability as well as the location of the structural loop regions. Human acceptor frameworks were selected on the basis that they were substantially similar to the framework regions of the murine H8 antibody, or which were most similar to the consensus sequence of the variable region subfamily. *See* Figures 18-23. Consideration was also given to representation of the framework loci in humans, such that widely represented sequences were preferred over less populous sequences. Additional mutations of the human framework acceptor sequences were made, for example to restore murine residues believed to be involved in antigen contacts and/or residues involved in the structural integrity of the antigen-binding site. The amino acid sequence was also optimized for codon preference of CHO cells and to remove restriction enzyme sites. A peptide structure prediction program was used to analyze the humanized variable heavy and light region sequences to identify and avoid post-translational protein modification sites introduced by the humanization design. Using this strategy, three versions of humanized H8 variable regions were constructed. Version 1 retains murine H8 residues at positions within the framework sequence believed to be critical for antibody integrity and antigen binding. Version 2 retains murine residues only in the CDRs. Version 3 is similar to version 2, with the exception that a consensus variable region sequence was

used as the heavy chain acceptor framework. The light chain variable region of the version 3 antibody is the same as that of the Version 2 antibody. *See* Figures 24A-24C.

The H8 anti-5T4 antibody variable heavy and light regions were cloned using the SMART® cDNA synthesis (Clontech) followed by PCR amplification. The cDNA was synthesized from 1 µg total RNA isolated from the H8 hybridoma cells, using oligo(dT) and the SMART® IIA oligo with POWERSCRIPT™ reverse transcriptase (Clontech). The cDNA was then amplified by PCR using a primer which anneals to the SMART® IIA oligo sequence and a human constant region specific primer (mouse Kappa for the light chain, mouse IgG1 for the heavy chain) with VENT® polymerase. Heavy and light chain PCR products were subcloned into the pED6 expression vector and the nucleic acid sequence was determined. This method is advantageous in that no prior knowledge of the DNA sequence is required. In addition, the resultant DNA sequence is not altered by use of degenerate PCR primers.

Several discrepancies were noted between the nucleotide sequence of murine H8 when compared to the published nucleotide sequence (PCT International Publication No. WO 98/55607 and in Forsberg et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272(19):124430-12436). The noted differences do not alter the protein sequence. The T (published) to C difference present in the codon for amino acid 133 of the heavy chain variable region correlates with the codons ACT and ACC, respectively. Both ACT and ACC code for the amino acid threonine (T). The T (published) to C difference present in the codon for amino acid 138 of the heavy chain variable region correlates with the codons TCT and TCC, respectively. Both TCT and TCC code for the amino acid serine (S). The A (published) to C difference present in the codon for amino acid 126 of the light chain variable region correlates with the codons ATA and ATC, respectively. Both ATA and ATC code for the amino acid isoleucine (I).

For construction of humanized H8 light chain variable regions, the DPK24 germ line sequence VL-IV/locus B3 was used as the acceptor framework. The DPK24 sequence is 68% identical to the murine H8 light chain variable region and contains 18 amino acid substitutions when compared to the murine H8 light chain framework sequences. Humanized H8 light chain variable region version 1 maintained murine H8 residues S43, S49, and F87. Mutations which were determined to increase expression include F10S, T45K, I63S, Y87S, F73L, and T77S. *See* Figure 18.

Humanized antibodies were also constructed using framework regions of the light chain variable region of germline clone subgroups VκII and Vκ. *See* Figures 19-20. In particular, antibodies that include light chain VκII subgroups framework regions and the disclosed humanized H8 antibody version 1 are both highly expressed and stable. Nine mutations (T7S, D17E, V19A, S50Y, I63S, Y87S, F73L, T77S, and F87Y) for humanization of the H8 light chain variable region based on the VκII germline frameworks L16, L2, A27,

PCT/US05/32196

L8, L10, and L25 have been introduced in humanized H8 antibody version 2 and do not compromise binding affinity. Similarly, ten mutations (T7S, F10S, V19A, T46K, S50Y, I63S, T67S, F73L, T77S, and F87Y) for humanization of the H8 light chain variable region based on the germline frameworks from subgroup Vκ have been introduced in humanized H8 antibody without affecting binding affinity. In addition, substitutions of amino acids at positions 1, 9, 10, 12, 15, 22, 43, 45, and 83 of the H8 light chain variable region do not affect antigen binding.

For construction of humanized H8 heavy chain variable regions, the DP75 germ line sequence VH-I/locus 1-02 was used as the acceptor sequence. The DP75 sequence is 65% identical to the murine H8 heavy chain variable region and contains 28 amino acid substitutions when compared to the murine H8 heavy chain framework sequence. Humanized H8 heavy chain variable region version 1 maintained murine H8 residues K38 and S40, which are important for antigen contact with the heavy chain and light chain variable regions, as well as I48, which is important for antigen contact with the variable regions and with CDR2. *See* Figure 21. Alternatively, humanized H8 heavy chain version 3 was prepared using a heavy chain variable region subgroup consensus sequence. The consensus sequence contains 25 amino acid substitutions when compared to the murine H8 heavy chain framework sequence. *See* Figures 22-23.

The humanized H8 heavy chain and light chain variable regions were constructed by annealing together overlapping oligonucleotides and ligating them into the pED6 expression vector containing a human antibody constant region. Humanized heavy chain and light chain variable regions may also be constructed using PCR mutagenesis or site-directed mutagenesis. Design of the oligonucleotides included optimization of codon usage for CHO cell expression and removal of restriction enzyme sites. A *Bgl* II restriction site was removed from the H8 variable heavy region. Oligonucleotides used to synthesize humanized H8 light chain variable region version 1 are set forth as SEQ ID NOs:27-32. Oligonucleotides used to synthesize humanized H8 light chain variable region version 2 are set forth as SEQ ID NOs:33-36. Oligonucleotides used to synthesize humanized H8 heavy chain variable region version 1 are set forth as SEQ ID NOs:37-44. Oligonucleotides used to synthesize humanized H8 heavy chain variable region version 2 are set forth as SEQ ID NOs:37, 39-42, and 44-46. Oligonucleotides used to synthesize humanized H8 heavy chain variable region version 3 are set forth as SEQ ID NOs:37, 40, 41, and 44-48.

To assess the novelty of the humanized H8 variable region sequences, BLASTp searches (for protein query sequences) were conducted using default parameters of Expect=10, Word Size=3, a low complexity filter, and the BLOSUM62 matrix, permitting gap costs of existence=11, and extension=1. BLASTn searches (for nucleotide query sequences) were conducted using default parameters of Expect=10, Word Size=11, and a low

complexity filter. BLAST search results are reported as a list of sequences related to the query sequence, ranked in order of E value, which is an indicator of the statistical significance of matches identified in the database. Sequences most closely related to the humanized variable region sequences used for BLAST analysis are identified in Table 5 (BLASTp) and Table 6 (BLASTn). The BLAST results and an alignment of each query sequence with the most closely related subject sequence are shown in Figures 25A-25O.

Table 5

BLASTp Analysis

Query Sequence	Identity (%) of Closest Subject Sequence	Description of Closest Subject Sequence	Figure
VL version 1 (SEQ ID NO:17)	77%	gi|229528|prf|751423A protein Len, Bence-Jones	25A
VL version 2 (SEQ ID NO:23)	80%	gi|229528|prf|751423A protein Len, Bence-Jones	25C
VH version 1 (SEQ ID NO:18)	82%	gi|181791|gb|AAB16857.1 *Homo sapiens* immunoglobulin IgM heavy chain VH1 region	25B
VH version 2 (SEQ ID NO:21)	85%	gi|181791|gb|AAB16857.1 *Homo sapiens* immunoglobulin IgM heavy chain VH1 region	25D
VH version 3 (SEQ ID NO:19)	80%	gi|17939658|gb|AAH19337.1| *Homo sapiens* IGHG1 protein	25E

Table 6

BLASTn Analysis

Query Sequence	Identity (%) of Closest Subject Sequence	Description of Closest Subject Sequence	Figure
VL version 1 (SEQ ID NO:81)	90%	gi|7769338|gb|AF206032.1 Mus musculus hybridoma 16B2-A1 anti-myosin immunoglobulin light chain variable region mRNA, partial cds	25J-25K
VL version 2 (SEQ ID NO:22)	89%	gi|7769338|gb|AF206032.1 *Mus musculus* hybridoma 16B2-A1 anti-myosin immunoglobulin light chain variable region mRNA, partial cds	25F-25G
VH version 1 (SEQ ID NO:82)	93%	gi|34539549|gb|AY369876.1 Mus musculus clone BaPFO-17 immunoglobulin mu heavy chain variable region mRNA, partial cds	25L-25M
VH version 2 (SEQ ID NO:20)	90%	gi|47109385|emb|AJ704536.1 synthetic construct for anti-PLAP ScFv antibody, clone GLC4	25H-25I
VH version 3 (SEQ ID NO:83)	90%	gi|47109385|emb|AJ704536.1| Synthetic construct for anti-PLAP ScFv antibody, clone GLC4	25N-25O

To confirm that the chimeric and humanized antibodies could be expressed, COS-1 cells were transiently transfected with plasmids encoding representative anti-5T4 antibodies of the invention. After a period of 48 hours, the cell culture medium was assayed to

determine levels of human IgG antibodies using an ELISA. As shown in Table 7, all of the anti-5T4 antibodies were expressed.

Table 7

Expression of Chimeric and Humanized Anti-5T4 Antibodies

Antibody	human IgG in cell culture medium (µg/ml)	fold increase in expression relative to chimeric H8
Chimeric H8 (mVH / mVL)	0.5	–
Semi-Humanized H8 (mVH / hVL1)	8.4	17
Humanized H8 version 1 (hVH1 / hVL1)	3.6	7
Humanized H8 version 2/1 (hVH2 / hVL1)	2.0	4
Humanized H8 version 1/2 (hVH1 / hVL2)	4.3	9
Humanized H8 version 2 (hVH2 / hVL2)	2.1	4

mVH, murine H8 heavy chain variable region
mVL, murine H8 light chain variable region
hVH1, humanized H8 heavy chain variable region version 1
hVL1, humanized H8 light chain variable region version 1
hVH2, humanized H8 heavy chain variable region version 2
hVL2, humanized H8 light chain variable region version 2

To assess the binding specificity and affinity of chimeric and humanized H8 antibodies, BIACORE® analysis was performed using human 5T4 antigen immobilized on a CM5 chip. BIACORE® technology utilizes changes in the refractive index at the surface layer upon binding of the antibody to the 5T4 antigen immobilized on the layer. Binding is detected by surface plasmon resonance (SPR) of laser light refracting from the surface. Analysis of the signal kinetics on rate and off rate allows the discrimination between non-specific and specific interaction. The concentration of antibody used was in the range of 12.5 nM to 200 nM. *See* Table 8. Chimeric, semi-humanized, and humanized H8 antibodies performed similarly to the murine H8 antibody in the BIACORE® assay.

Table 8

Results of BIACORE® Assay

Antibody	KD (M)	kd (1/s)	ka (1/Ms)
Murine H8	5.8×10^{-10}	5.9×10^{-5}	1.0×10^{5}
Chimeric H8 (mVH / mVL)	3.0×10^{-10}	4.2×10^{-5}	1.4×10^{5}
Humanized H8 version 1 (hVH1 / hVL1)	8.4×10^{-10}	7.8×10^{-5}	0.9×10^{5}
Humanized H8 version 2 (hVH2 / hVL2)	1.2×10^{-10}	1.3×10^{-5}	1.1×10^{5}
Humanized H8 version 3 (hVH3 / hVL2)	1.2×10^{-10}	1.9×10^{-5}	1.5×10^{5}

*m*VH, murine H8 heavy chain variable region
*m*VL, murine H8 light chain variable region
hVH1, humanized H8 heavy chain variable region version 1
hVL1, humanized H8 light chain variable region version 1
hVH2, humanized H8 heavy chain variable region version 2
hVL2, humanized H8 light chain variable region version 2
hVH3, humanized H8 heavy chain variable region version 3

To assess selectivity of binding, FACS analysis was performed to detect 5T4 antigen on MDAMB435/neo cells or on MDAMB435/5T4 cells using murine H8, chimeric versions of H8, and humanized versions of H8 at the indicated concentrations. All antibodies show selective binding to 5T4-expressing cells. *See* Figures 28A-28B.

The binding properties of chimeric H8 antibody and humanized H8 versions 1-3 were determined using a competitive binding assay as follows. ELISA plates were coated with human 5T4 antigen. To each well was added 100µl of 1µg/ml 5T4 antigen in PBS-CMF pH 7.2. The plates were incubated overnight at 4°C. After coating with antigen, plates were washed in a blocking solution of 0.02% casein in PBS-CMF, pH 7.2 for 2-4 hours at room temperature. Serial dilutions of 250ng/ml chimeric H8 antibody in assay buffer (0.5% BSA + 0.02% TWEEN®-20 in PBS) were prepared, transferred to the coated and blocked ELISA plate, and incubated for 1-2 hours at room temperature. Plates were washed 4 times with 200 µl of 0.09% TWEEN®-20 in PBS. The signal was developed for 10-15 minutes at room temperature following addition of 100µl BIOFX® TMB (Biofx Laboratories, Inc. of Randallstown, Maryland) per well. The reaction was stopped by addition of 100µl per well of 0.18 N H_2SO_4. All incubation and wash steps were performed with gentle agitation. ELISA

plates were read at 450nm. The ED50 of biotinylated antibody binding to antigen was determined by plotting OD_{450} (duplicate data points averaged) as a function of biotinylated antibody concentration. Competition ELISAs were performed by preparing coated and blocked ELISA plates as above, transferring to such plates serial dilutions of test antibody along with biotinylated chimeric H8 antibody at the calculated ED50 concentration. The biotin label was amplified using streptavidin-HRP diluted 1:10,000 in assay buffer, followed by signal development and quantification as above. *See* Figure 29.

To assess whether humanized anti-5T4 antibodies are internalized following binding to 5T4 antigen, the amount of antibody detected at the cell surface of MDAMB435/5T4 cells was determined using FACS analysis as described in Example 1. As observed for chimeric H8 antibody and H8 antibody/calicheamicin conjugates, humanized H8 antibodies were internalized by 5T4-expressing cells. *See* Figure 30.

Example 6

Transient and Stable Expression of Humanized H8 Antibodies

For large scale production of humanized H8 antibodies, stable CHO cell lines that express humanized H8 versions 1-3 were prepared. As an initial step, the level of antibody production was assessed following transient expression of the encoding vectors in COS-1 cells. DNA encoding humanized H8 heavy chains and light chains were subcloned into the bi-cistronic expression vectors pSMED2 (methotrexate resistance) and pSMEN2 (neomycin resistance), respectively. The three humanized H8 antibodies were expressed at similar levels, which were greater than that observed for chimeric H8 antibody. *See* Figure 31.

For expression in CHO cells, the human IgG4 mutated constant region was further optimized by removing three introns, which resulted in higher expression and stability of humanized H8 antibodies. CHO cell lines expressing humanized H8 antibodies were prepared by co-transfecting pSMED2_huH8 heavy chain and pSMEN2_huH8 light chain into the pre-adapted CHO Dukx cell line 153.8. The expression level of the lead clone, selected in 50 nM methotrexate, had an average titer of 17 mg/liter/24 hours and an average cellular productivity of 10 $\mu g/10^6$ cells/24 hours. The lead pool, selected in 50 nM methotrexate and G418 (1 mg/ml), had an average titer of 8 mg/liter/24 hours and its average cellular productivity was 6 $\mu g/10^6$ cells/24 hours.

Example 7

Preparation and Characterization of

Humanized H8-Calicheamicin Conjugates

Humanized H8 antibodies were conjugated to calicheamicin essentially as described in Example 2. Additives deoxycholate and sodium decanoate each produced a conjugate with low levels of unconjugated protein and aggregate. *See* Table 9.

Table 9

Conjugation of Humanized H8 and Calicheamicin at 5 mg Production Scale

	End of reaction data			
Additive/conc	Protein (mg/mL)	Loading (mcg/mg)	Aggregate	LCF
Deoxycholate/10mM	5.27	78.9	7.1	1.88
Decanoate/ 37.5mM	4.95	84.8	7.07	0

The binding kinetics of murine H8, humanized H8, and humanized H8 calicheamicin conjugate were compared by plasmon resonance, essentially as described in Example 2. The conjugate sample contained 61 µg CalichDMH per mg protein, 1% free antibody, and 1.4 % aggregate. The binding properties of humanized H8 version 2-calicheamicin conjugates were comparable to that of murine H8-calicheamicin conjugates (Table 10), indicating that neither humanization of the antibody nor conjugation to calicheamicin affected the binding to 5T4. These results were independently confirmed by determining the binding of the antibodies and conjugates on 5T4 expressing tumor cells using flow cytometry.

Table 10

Results of BIACORE® Assay Using Antibody/Calicheamicin (CM) Conjugates

Conjugate	KD (M)	kd (1/s)	ka (1/Ms)
Murine H8 / CM	5.8×10^{-10}	5.9×10^{-5}	1.0×10^{5}
Humanized H8 version 2 / CM	1.7×10^{-10}	2.0×10^{-5}	1.2×10^{5}
Humanized H8 version 2 / AcBut / CalichDMH	2.6×10^{-10}	3.4×10^{-5}	1.3×10^{5}

Example 8

Anti-Tumor Efficacy of Humanized H8-Calicheamicin Conjugates *In Vitro*

To assess cytotoxicity of humanized H8-calicheamicin conjugates *in vitro*, MDAMB435/5T4 cells (human breast carcinoma cells overexpressing human 5T4 antigen) and MDAMB435/neo cells (control cells) were cultured in the presence of antibody-calicheamicin conjugates or free calicheamicin, essentially as described by Boghaert et al. (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10: 4538-4549. In Table 11, the cytotoxicity of each agent is reported as ED50 (ng/ml), which is the amount of calicheamicin given as conjugate or as free drug that caused 50% reduction of a cell culture relative to an untreated control. The number of cells in culture was determined using a vital dye (MTS) following 96 hours of drug exposure. The ED50 or the conjugate was consistently lower (3-fold t 6-fold) when added to MDAMB435/5T4 cells than when added to MDAMB435/neo cells.

The cytotoxicity of humanized H8-calicheamicin conjugates was also assessed using MDAMB435/5T4 and MDAMB435/neo cells cultured in a manner suitable for spheroid growth. This model approximates the conditions of a developing tumor and has an inherent greater resistance to cytotoxic drugs. Another advantage of the model is that it allows longer culturing periods. Following 144 hours of culture in the presence of antibody-calicheamicin conjugates or free calicheamicin, the dimensions of each spheroid was determined. As shown in Table 12, the ED50 of huH8-AcBut-CalichDMH was 6-fold lower when added to MDAMB435/5T4 cells than when added to MDAMB435/neo cells.

Using either assay, humanized H8-calicheamicin conjugates were substantially more potent at inducing cytotoxicity and inhibiting spheroid growth when compared to free calicheamicin or to CMA-676, an anti-CD33-calicheamicin conjugate. Selective toxicity of PC14PE6 cells could be demonstrated in a colony forming assay and spheroid assay but not in a vital dye assay. The results demonstrate that the cytotoxicity of the conjugate relates directly to the amount of 5T4 expressed by the cells. In addition the conjugate is more efficacious than free drug (CalichDMH) or control conjugate (CMA-676).

Table 11

Results for MTS Assay

Cells	MDAMB435/5T4		MDAMB435/neo	
Experiment	A	B	A	B
ED50 (ng/ml) CalichDMH	10	4	2.3	2.2
ED50 (ng/ml) huH8-AcBut-CalichDMH	0.15	0.13	0.43	0.8
ED50 (ng/ml) CMA-676	40	>400	30	70
X-fold potency of huH8-AcBut-CalichDMH compared to CalichDMH	100	31	5.3	2.8
X-fold potency of huH8-AcBut-CalichDMH compared to CMA-676	267	>3,077	70	80

CalichDMH, free calicheamicin
huH8-AcBut-CalichDMH, humanized H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-(4'-acetylphenoxy)butanoic acid (AcBut)
CMA-676, anti-CD33 antibody conjugates to calicheamicin
Experiments A & B, experiments performed on separate days

Table 12

Results for Spheroid Growth Assay

Cells	MDAMB435/5T4	MDAMB435/neo
ED50 (ng/ml) CalichDMH	1.6	2
ED50 (ng/ml) huH8-AcBut-CalichDMH	0.5	0.08
ED50 (ng/ml) CMA-676	11	3.2
X-fold potency of huH8-AcBut-CalichDMH compared to CalichDMH	3.2	25
X-fold potency of huH8-AcBut-CalichDMH compared to CMA-676	22	40

CalichDMH, free calicheamicin
huH8-AcBut-CalichDMH, humanized H8 antibody conjugated to calicheamicin using 4-(4'-acetylphenoxy)butanoic acid (AcBut)
CMA-676, anti-CD33 antibody conjugates to calicheamicin

Example 9

Anti-Tumor Efficacy of Humanized H8-Calicheamicin Conjugates

Using Subcutaneous Xenografts

To assess the cytotoxicity of humanized H8-calicheamicin conjugates *in vivo*, tumors were prepared in nude mice by subcutaneous injection of N87 cells (human gastric carcinoma cells), MDAMB435/5T4 cells (human breast carcinoma cells overexpressing human 5T4 antigen), or PC14PE6 cells (human non-small cell lung cancer cells). Humanized H8-calicheacmicin conjugates and control agents were administered by intraperitoneal injection to tumor-bearing mice in a total of 3 doses given at 4-day intervals, *i.e.*, on days 1, 5, and 9 following selection of tumors having achieved a size of approximately 0.08 cm^3 (Figures 33A-33C, 34A-34C, 35A-35C, and 35E) or on days 19, 23, and 27 following selection of tumors having achieved a size of 1.08 cm^3 (Figure 35D). In one study, animals bearing relapsed tumors were treated (Figure 35E). A total of 11 animals were treated with humanized H8-calicheamicin conjugates, and 13 animals were treated with the indicated control substances.

Response rates to therapy were determined 99 days after the first dose. Complete response rate (CR) is the percentage of surviving mice with a tumor size smaller or equal to the average initial tumor volume of the group. Partial response rate (PR) is the percentage of surviving mice with a tumor size smaller or equal to twice the average initial tumor volume of the group. Total response (TR) is the sum of CR and PR. No response (NR) is calculated as (100-TR). *See* Figures 33C, 34C, and 35C. Humanized H8-calicheamicin conjugates inhibited growth of all tumor types. *See* Figures 33A-33B, 34A-34B, 35A-35D, and 36A-36B. The amount of huH8-AcBut-CalichDMH needed to inhibit PC14PE6 cells, *i.e*, the minimal effective dose, is at least 16-fold lower than the maximal non-lethal dose.

CLAIMS

1. A chimeric or humanized anti-5T4 antibody comprising at least one light chain or at least one heavy chain, or a chimeric or humanized fragment thereof, wherein the antibody or antibody fragment

(a) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity of at least about 1×10^{-7} M to about 1×10^{-12} M;

(b) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity greater than 1×10^{-11} M;

(c) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity greater than 5×10^{-11} M;

(d) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity greater than a binding affinity of murine H8 anti-5T4 antibody binding to human 5T4 antigen;

(e) specifically targets 5T4-expressing cells *in vivo*;

(f) competes for binding to human 5T4 antigen with an antibody of any one of (a)-(e);

(g) specifically binds to an epitope bound by any one of (a)-(e); or

(h) comprises an antigen binding domain of any one of (a)-(e).

2. The chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 1 comprising constant regions derived from human constant regions.

3. The chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 2, wherein the human light chain constant region is derived from human kappa light chain constant region.

4. The chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 2, wherein the human heavy chain constant region is derived from a human IgG1 or human IgG4 heavy chain constant region.

5. The chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 4, wherein the human IgG1 heavy chain constant region comprises an amino acid sequence of any one of SEQ ID NOs:25 or 85-89.

6. The chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 4, wherein the human IgG4 heavy chain constant region comprises proline at position 241.

PCT/US05/32196

7. The chimeric anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 1, wherein the light chain variable region sequence comprises amino acids 1-107 of SEQ ID NO:1.

8. The chimeric anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 1, wherein the heavy chain variable region sequence comprises amino acids 1-120 of SEQ ID NO:2.

9. The chimeric anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 1, wherein the light chain comprises a variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:1, and wherein the heavy chain comprises a variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:2.

10. The chimeric anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 1, wherein

(a) the light chain comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO:1, and the heavy chain comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO:2; or

(b) the light chain comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO:3, and the heavy chain comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO:4.

11. The humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 1, wherein the variable region of the at least one light chain or at least one heavy chain comprises:

(a) framework regions comprising residues of a human antibody framework region; and

(b) one or more CDRs of the light chain variable region of SEQ ID NO:17 or one or more CDRs of the heavy chain variable region of SEQ ID NO:18.

12. The humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 11, wherein the framework regions comprise:

(a) a human antibody light chain framework region of a DPK24 subgroup IV germ line clone, a VκIII subgroup, or a Vκ subgroup germ line clone;

(b) a human antibody heavy chain framework region selected from the group consisting of DP-75, DP-8(VH1-2), DP-25, VI-2b and VI-3 (VH1-03), DP-15 and V1-8 (VH1-08), DP-14 and V1-18 (VH1-18), DP-5 and V1-24P (VH1-24), DP-4 (VH1-45), DP-7 (VH1-46), DP-10, DA-6 and YAC-7 (VH1-69), DP-88 (VH1-e), DP-3 and DA-8 (VH1-f);

(c) a consensus sequence of a heavy chain framework region of (b); or

(d) a framework region that is at least 95% identical to a framework region of (a)-(c).

13. The humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 11 comprising at least two CDRs of SEQ ID NOs:17 or 18.

14. The humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 13, wherein the light chain comprises a variable region comprising at least two of three CDRs of SEQ ID NO:17.

15. The humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 14, wherein the light chain comprises a variable region comprising three CDRs of SEQ ID NO:17.

16. The humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 11, wherein the heavy chain comprises a variable region comprising at least two of three CDRs of SEQ ID NO:18.

17. The humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 16, wherein the heavy chain comprises a variable region comprising three CDRs of SEQ ID NO:18.

18. The humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 11, wherein the light chain comprises the CDRs of SEQ ID NOs:17-18.

19. The humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 1, wherein the light chain variable region sequence comprises:

(a) an amino acid sequence of SEQ ID NO:17 or 23;

(b) an amino acid sequence that is at least 78% identical to SEQ ID NO:17; or

(c) an amino acid sequence that is at least 81% identical to SEQ ID NO:23.

20. The humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 1, wherein the light chain variable region sequence is encoded by a nucleic acid comprising:

(a) a nucleotide sequence of SEQ ID NO:22 or 81;

(b) a nucleotide sequence that is at least 80% identical to the nucleic acid of SEQ ID NO:22;

(c) a nucleotide sequence that is at least 91% identical to the nucleic acid of SEQ ID NO:81; or

(d) a nucleic acid that specifically hybridizes to the complement of SEQ ID NO:22 or SEQ ID NO:81 under stringent hybridization conditions.

21. The humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 1, wherein the heavy chain variable region sequence comprises:

(a) an amino acid sequence set forth as any one of SEQ ID NOs:18, 19, and 21;

(b) an amino acid sequence that is at least 83% identical to SEQ ID NO:18;

(c) an amino acid sequence that is at least 81% identical to SEQ ID NO:19; or

(d) an amino acid sequence that is at least 86% identical to SEQ ID NO:21.

22. The humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment of claim 1, wherein the heavy chain variable region sequence is encoded by a nucleic acid comprising:

(a) a nucleotide sequence of SEQ ID NO:20, 82, or 83;

(b) a nucleotide sequence that is at least 91% identical to the nucleic acid of SEQ ID NO:20 or SEQ ID NO:83;

(c) a nucleotide sequence that is at least 94% identical to the nucleic acid of SEQ ID NO:82; or

(d) a nucleic acid that specifically hybridizes to the complement of any one of SEQ ID NOs:20, 82, and 83 under stringent hybridization conditions.

23. A humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment comprising:

(a) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:5, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:6; or

(b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:5, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:6.

24. A humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment comprising:
    (a) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:7, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:8; or
    (b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:7, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:8.

25. A humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment comprising:
    (a) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:9, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:10; or
    (b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:9, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:10.

26. A humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment comprising:
    (a) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:11, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:12; or
    (b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:11, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:12.

27. A humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment comprising:
    (a) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:11, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:19; or
    (b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:11, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:84.

28. A humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment comprising:
    (a) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:11, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:8; or

(b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:11, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:8.

29. An antibody/drug conjugate for drug delivery comprising:

(a) a chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment; and

(b) a drug, which is directly or indirectly bound to the antibody or antibody fragment.

30. The antibody/drug conjugate of claim 29, wherein the chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment:

(a) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity of at least about 1×10^{-7} M to about 1×10^{-12} M;

(b) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity greater than 1×10^{-11} M;

(c) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity greater than 5×10^{-11} M;

(d) specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity greater than a binding affinity of murine H8 anti-5T4 antibody binding to human 5T4 antigen;

(e) specifically targets 5T4-expressing cells *in vivo*;

(f) competes for binding to human 5T4 antigen with an antibody of any one of (a)-(e);

(g) specifically binds to an epitope bound by any one of (a)-(e); or

(h) comprises an antigen binding domain of any one of (a)-(e)

31. The antibody/drug conjugate of claim 29, wherein the chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment comprises:

(a) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:5, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:6; or

(b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:5, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:6.

32. The antibody/drug conjugate of claim 29, wherein the chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment comprises:

(a) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:7, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:8; or

(b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:7, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:8.

33. The antibody/drug conjugate of claim 29, wherein the chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment comprises:

(a) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:9, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:10; or

(b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:9, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:10.

34. The antibody/drug conjugate of claim 29, wherein the chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment comprises:

(a) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:11, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:12; or

(b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:11, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:12.

35. The antibody/drug conjugate of claim 29, wherein the chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment comprises:

(a) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:11, and a heavy chain variable region comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO:19; or

(b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:11, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:84.

36. The antibody/drug conjugate of claim 29, wherein the chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment comprises:

(a) a light chain variable region comprising an amino acid sequence of residues 1-107 of SEQ ID NO:11, and a heavy chain variable region

comprising an amino acid sequence of residues 1-120 of SEQ ID NO:8; or

(b) a light chain amino acid sequence of SEQ ID NO:11, and a heavy chain amino acid sequence of SEQ ID NO:8.

37. The antibody/drug conjugate of claim 29, wherein the drug is a therapeutic agent selected from the group consisting of a cytotoxin, a radioisotope, an immunomodulatory agent, an anti-angiogenic agent, an anti-proliferative agent, a pro-apoptotic agent, a chemotherapeutic agent, and a therapeutic nucleic acid.

38. The antibody/drug conjugate of claim 37, wherein the therapeutic agent is a cytotoxin.

39. The antibody/drug conjugate of claim 38, wherein the cytotoxin is an antibiotic, an inhibitor of tubulin polymerization, an alkylating agent, a protein synthesis inhibitor, a protein kinase inhibitor, a phosphatase inhibitor, a topoisomerase inhibitor, or an enzyme.

40. The antibody/drug conjugate of claim 39, wherein the cytotoxin is an antibiotic.

41. The antibody/drug conjugate of claim 40, wherein the antibiotic is calicheamicin.

42. The antibody/drug conjugate of claim 41, wherein the calicheamicin is an N-acetyl derivative or disulfide analog of calicheamicin.

43. The antibody/drug conjugate of claim 42, wherein the calicheamicin is N-acetyl-γ-calicheamicin.

44. The antibody/drug conjugate of claim 29, wherein the drug is bound to the antibody via a linker.

45. The antibody/drug conjugate of claim 44, wherein the linker is selected from the group consisting of 4-(4'acetylphenoxy)butanoic acid (AcBut), 3-acetylphenyl acidic acid (AcPac), 4-mercapto-4-methyl-pentanoic acid (Amide), and derivatives thereof.

PCT/US05/32196

46. A method for delivering a drug to 5T4-expressing cells comprising contacting the cells with an antibody/drug conjugate comprising (I) a chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment, and (II) a drug which is bound to the humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment directly or indirectly.

47. The method of claim 46, wherein the drug is internalized in a target cell.

48. A method for treating a subject having a 5T4-positive cancer, said method comprising administering to the subject a therapeutically effective amount of an anti-5T4 antibody/drug conjugate comprising (I) a chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment, and (II) a therapeutic agent which is bound to the chimeric or humanized anti-5T4 antibody or antibody fragment directly or indirectly.

49. The method of claim 48, wherein the anti-5T4 antibody/drug conjugate is a anti-5T4 antibody/calicheamicin conjugate, and further comprising administering a second therapeutic agent, wherein the anti-5T4/calicheamicin conjugate and the second therapeutic agent are administered concurrently or consecutively in either order.

FIG. 1

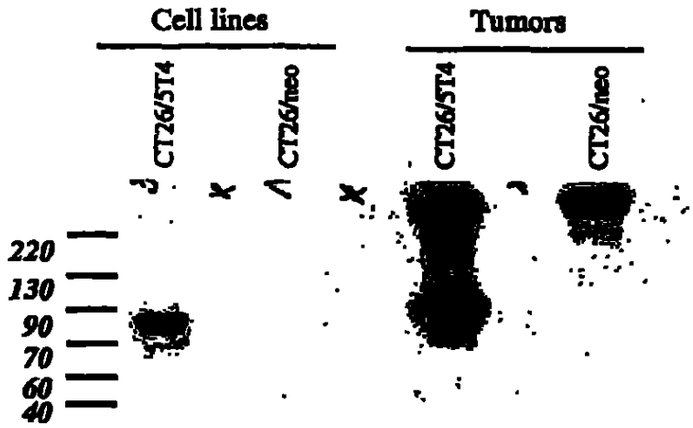

Cell lines
Tumors
CT26/5T4
CT26/neo
CT26/5T4
CT26/neo
220
130
90
70
60
40

FIG. 2

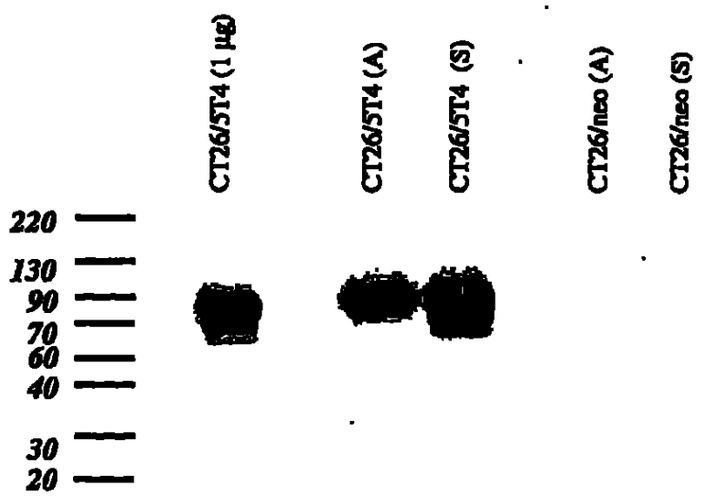

CT26/5T4 (1 µg)
CT26/5T4 (A)
CT26/5T4 (S)
CT26/neo (A)
CT26/neo (S)
220
130
90
70
60
40
30
20

FIG. 3A

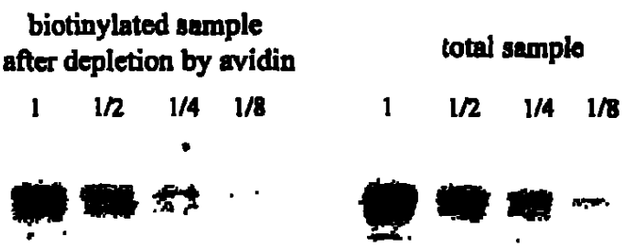

biotinylated sample
after depletion by avidin
1
1/2
1/4
1/8
total sample
1
1/2
1/4
1/8

FIG. 3B

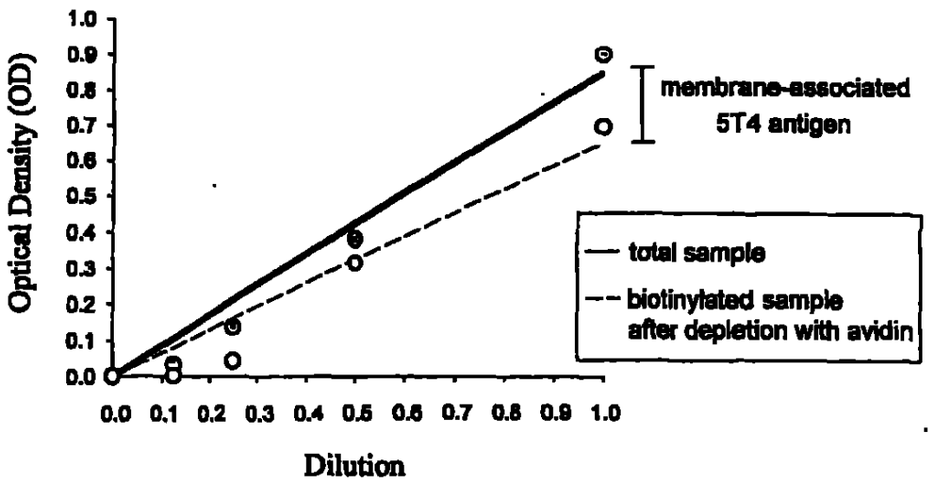

Optical Density (OD)
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0
Dilution
membrane-associated
5T4 antigen
total sample
biotinylated sample
after depletion with avidin

FIG. 4

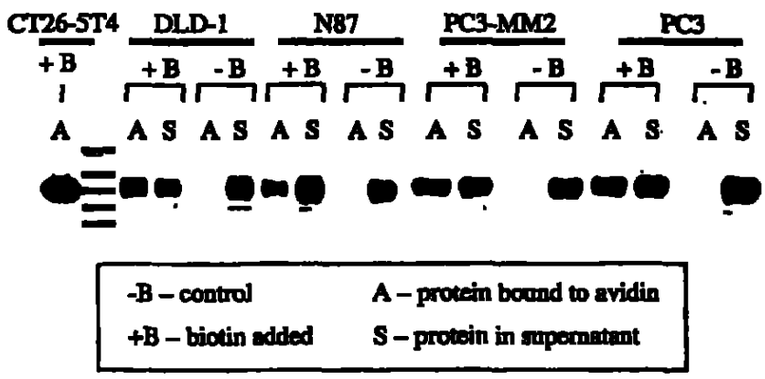

CT26-5T4
DLD-1
N87
PC3-MM2
PC3
+B
+B -B +B -B +B -B +B -B
A A S A S A S A S A S A S A S A S
-B – control
+B – biotin added
A – protein bound to avidin
S – protein in supernatant

FIG. 5A

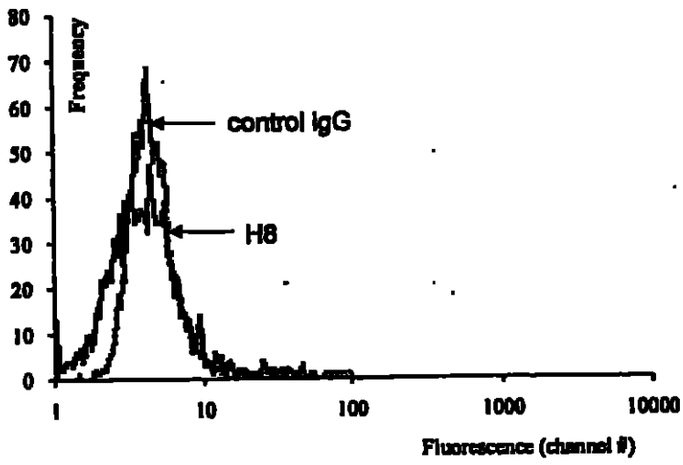

Frequency
control IgG
H8
Fluorescence (channel #)

FIG. 5B

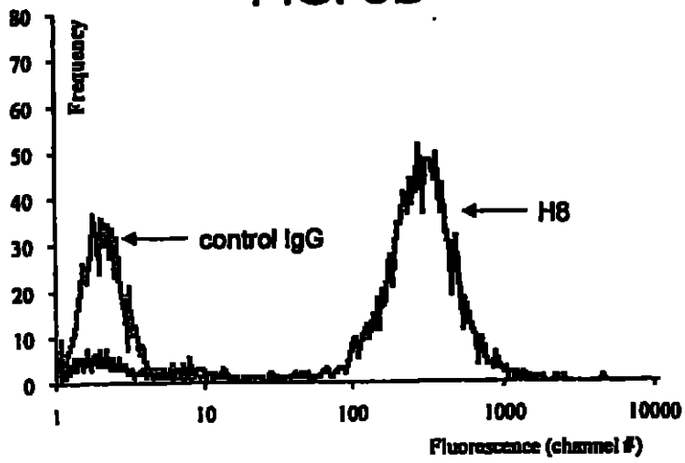

Frequency
control IgG
H8
Fluorescence (channel #)

FIG 6

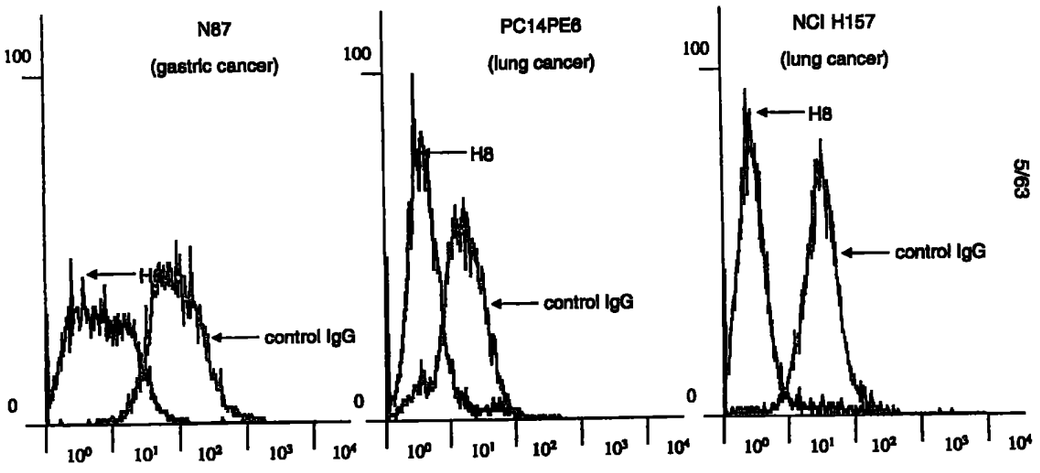

N87
(gastric cancer)
100
0
H8
control IgG
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
PC14PE6
(lung cancer)
100
0
H8
control IgG
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
NCI H157
(lung cancer)
100
0
H8
control IgG
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4

FIG. 7

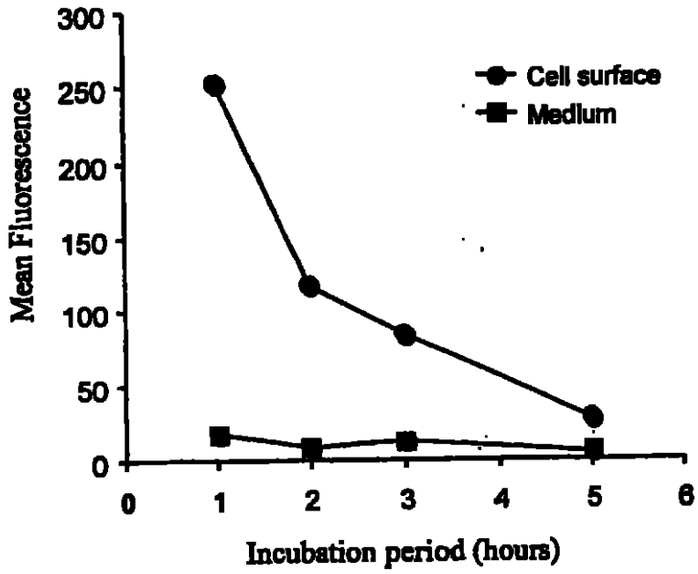

300
250
200
150
100
50
0
Mean Fluorescence
0
1
2
3
4
5
6
Incubation period (hours)
Cell surface
Medium

FIG. 8

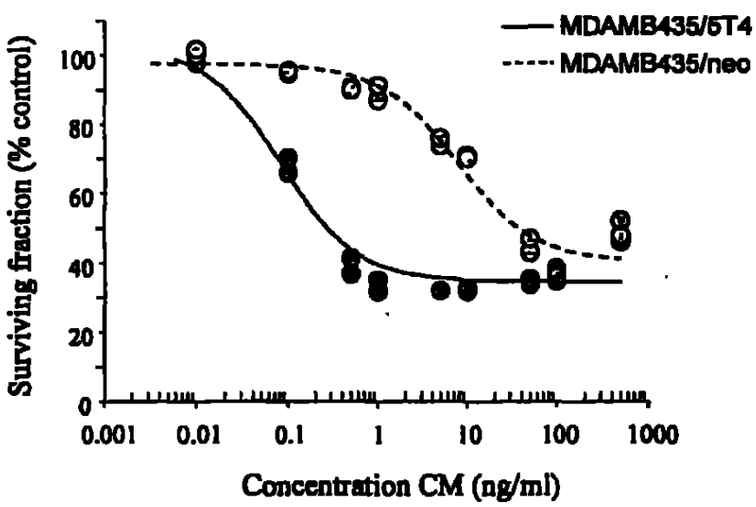

MDAMB435/5T4
MDAMB435/neo
Surviving fraction (% control)
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentration CM (ng/ml)

FIG. 9A

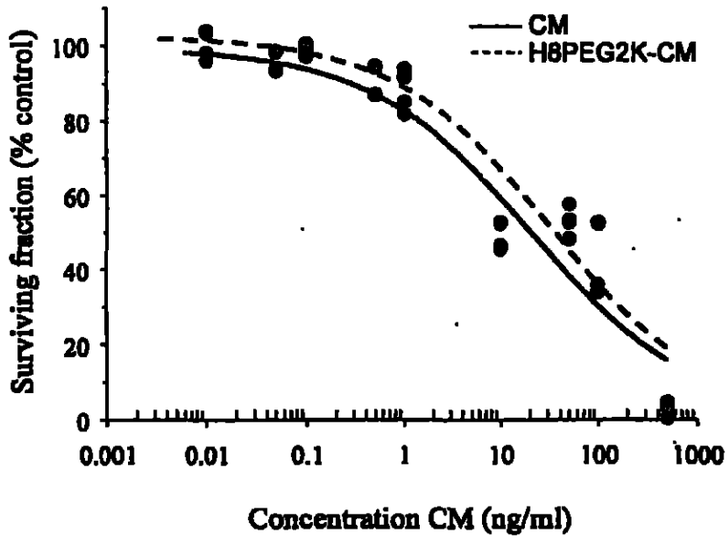

CM
H8PEG2K-CM
Surviving fraction (% control)
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentration CM (ng/ml)

FIG. 9B

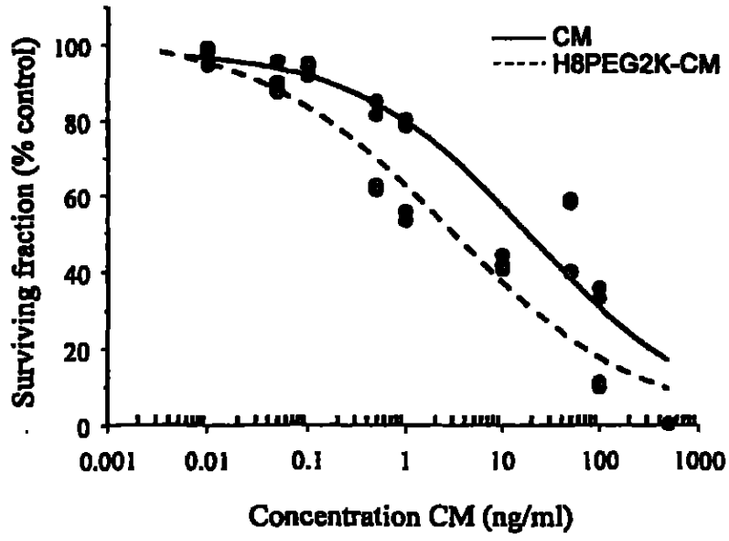

CM
H8PEG2K-CM
Surviving fraction (% control)
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentration CM (ng/ml)

FIG. 10

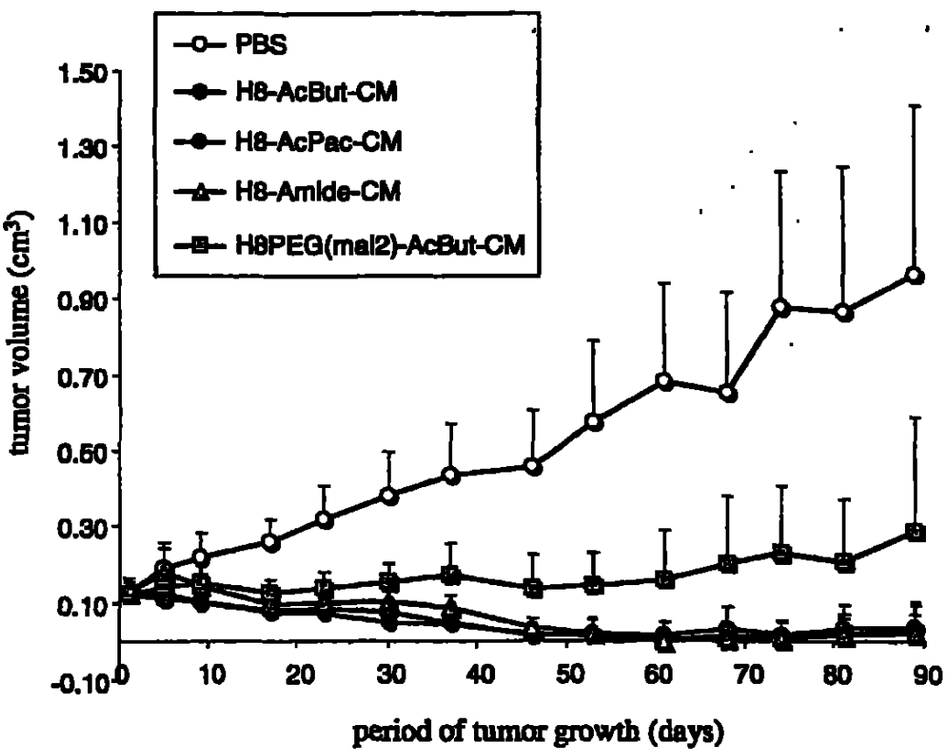

PBS
H8-AcBut-CM
H8-AcPac-CM
H8-Amide-CM
H8PEG(mal2)-AcBut-CM
tumor volume (cm3)
1.50
1.30
1.10
0.90
0.70
0.50
0.30
0.10
-0.10
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
period of tumor growth (days)

FIG. 11A

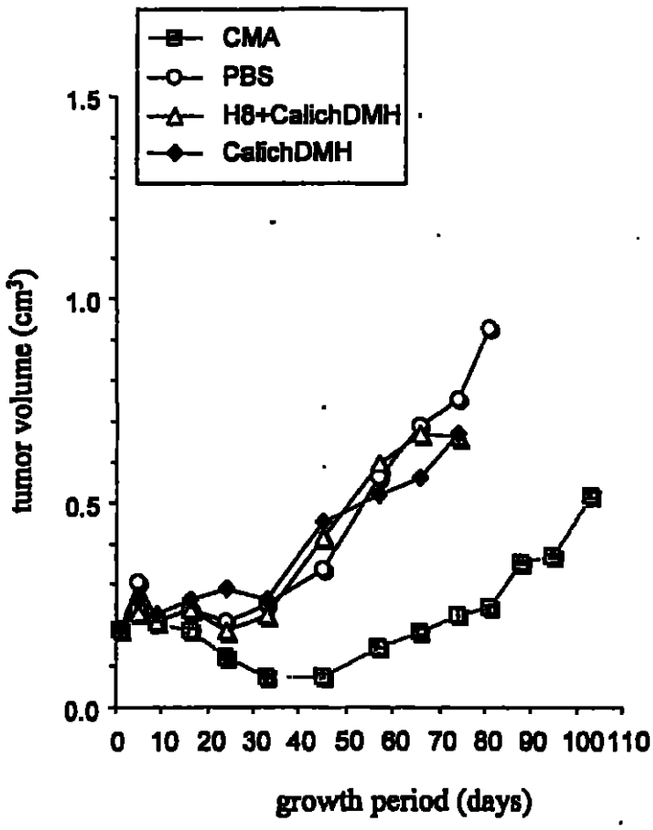

CMA
PBS
H8+CalichDMH
CalichDMH
tumor volume (cm3)
1.5
1.0
0.5
0.0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
growth period (days)

FIG. 11B

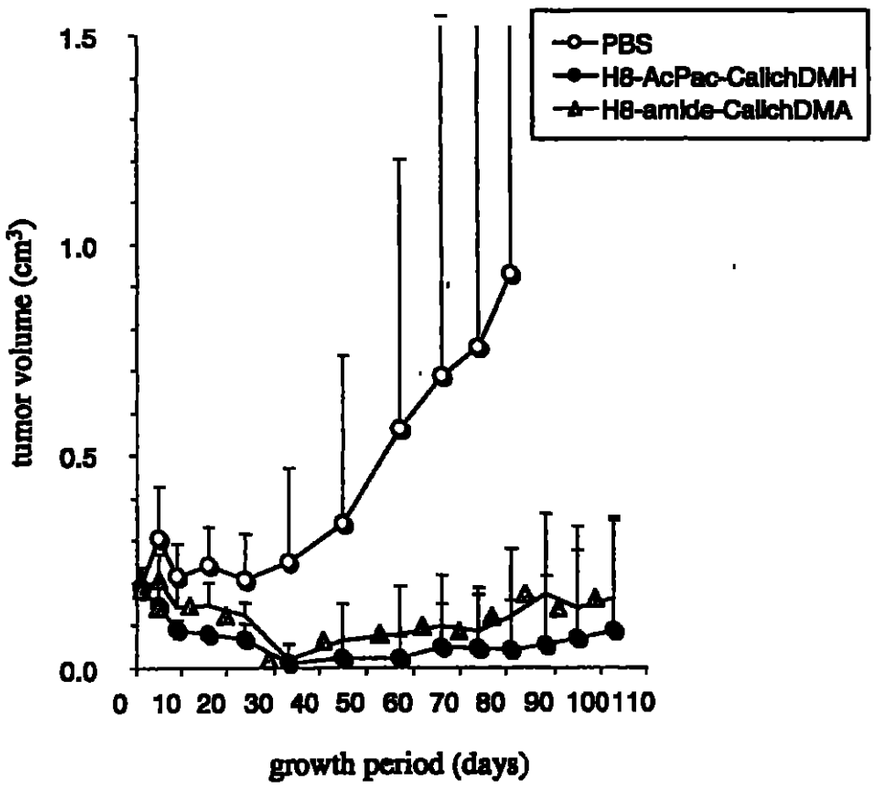

PBS
H8-AcPac-CalichDMH
H8-amide-CalichDMA
tumor volume (cm3)
1.5
1.0
0.5
0.0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100110
growth period (days)

FIG. 12

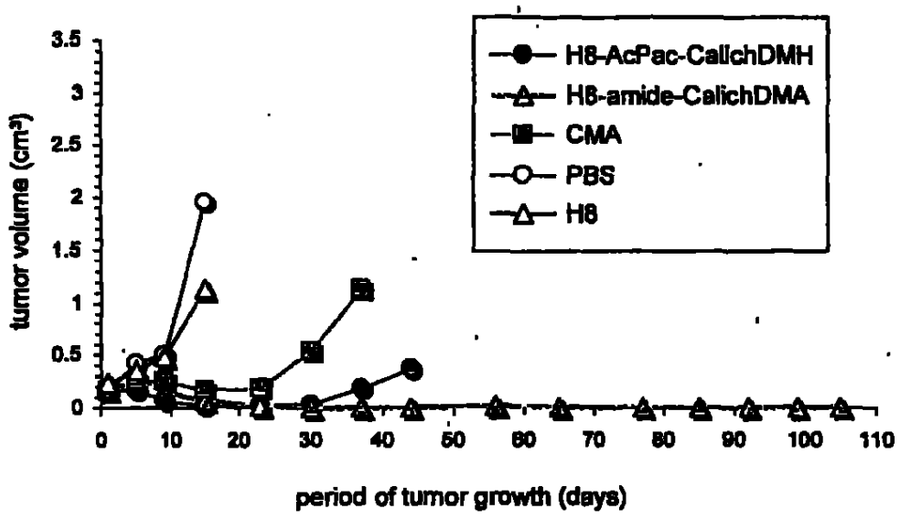

H6-AcPac-CalichDMH
H6-amide-CalichDMA
CMA
PBS
H6
tumor volume (cm³)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
period of tumor growth (days)

FIG. 13A

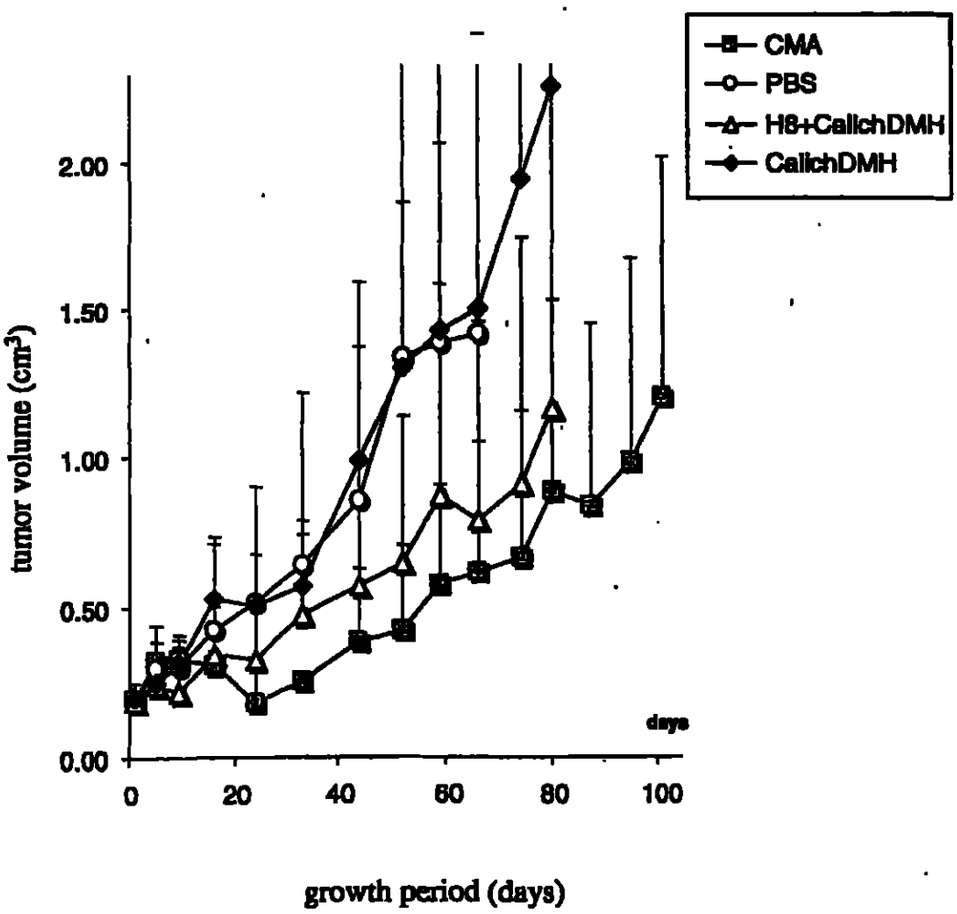

CMA
PBS
H8+CalichDMH
CalichDMH
tumor volume (cm³)
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
days
0
20
40
60
80
100
growth period (days)

FIG. 13B

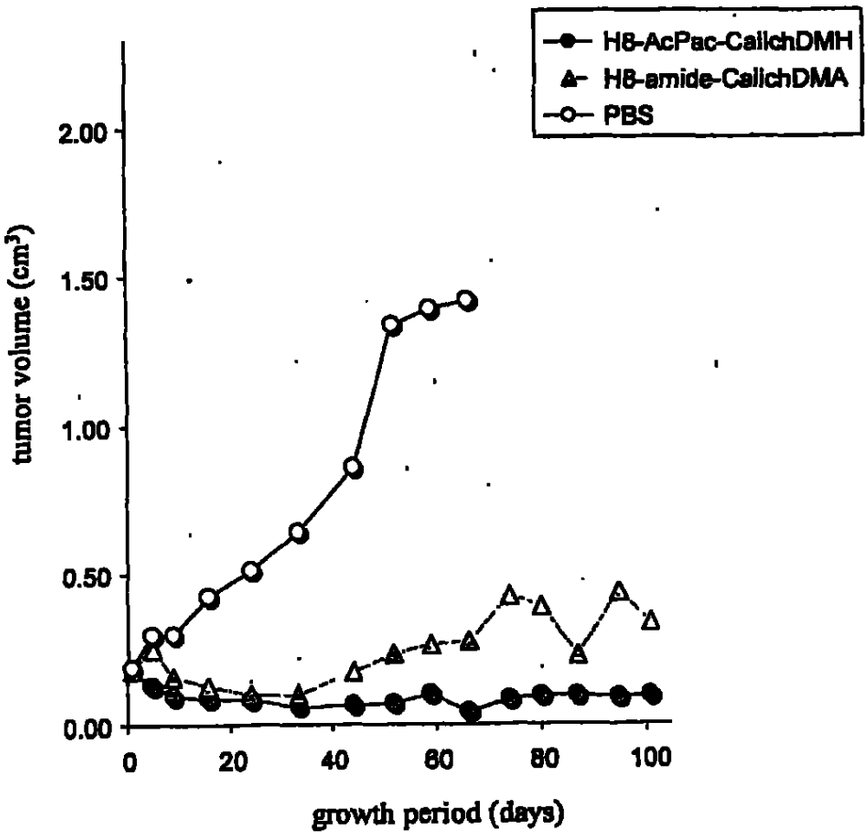

H8-AcPac-CalichDMH
H8-amide-CalichDMA
PBS
tumor volume (cm3)
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
0
20
40
60
80
100
growth period (days)

FIG. 14

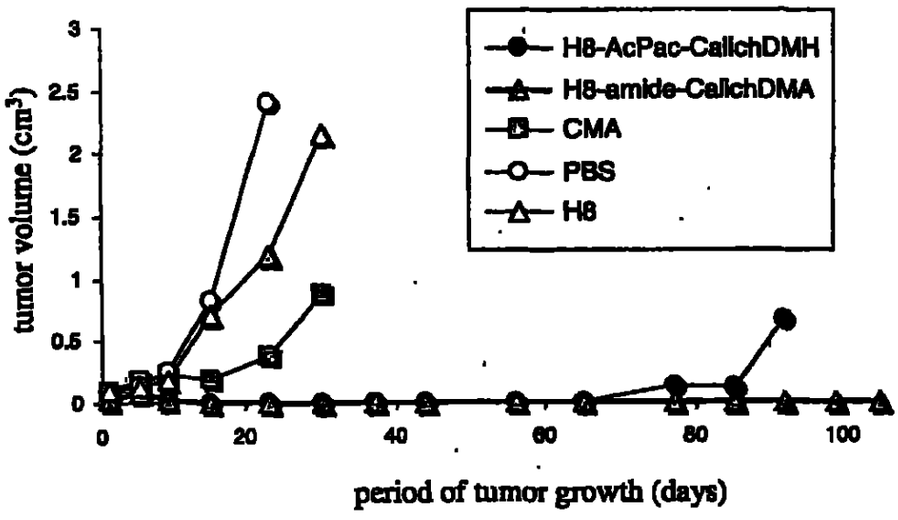

H8-AcPac-CalichDMH
H8-amide-CalichDMA
CMA
PBS
H8
tumor volume (cm3)
period of tumor growth (days)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
0
20
40
60
80
100

FIG 15A FIG 15B FIG 15C

FIG 15D FIG 15E FIG 15F FIG 15G

WO 2006/031653

PCT/US2005/032196

FIG 16

FIG. 17

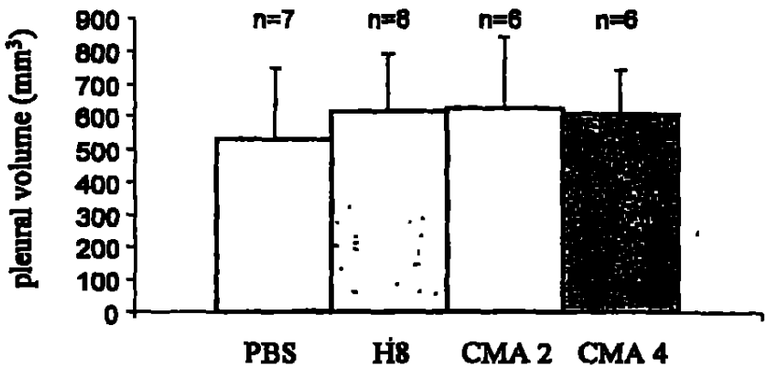
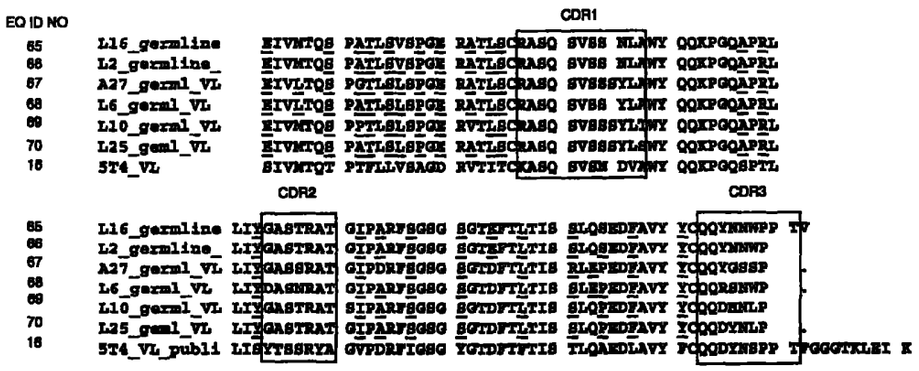

pleural volume (mm³)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
n=7
n=8
n=6
n=6
PBS
H8
CMA 2
CMA 4

FIG 18

```
                                        CDR-L1
DPK24  DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPP
H8     SIVMTQTPTFLLVSAGDRVTITCKASQSV.      SNDVAWYQQKPGQSP
          * CDR-L2                        *  CDR-L3
DPK24  KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYST
H8     TLLISYTSSRYAGVPDRFIGSGYGTDFTFTISTLQAEDLAVYFCQQDYNS 94

DPK24  P    .   --
H8     |
       PPTFGGGTKLEIKR 108
```

FIG 19


EQ ID NO
CDR1
CDR2
CDR3
65 L16_germline EIVMTQS PATLSVSPGE RATLSCRASQ SVSS NLAWY QQKPGQAPRL
66 L2_germline_ EIVMTQS PATLSVSPGE RATLSCRASQ SVSS NLAWY QQKPGQAPRL
67 A27_germl_VL EIVLTQS PGTLSLSPGE RATLSCRASQ SVSSSYLAWY QQKPGQAPRL
68 L6_germl_VL EIVLTQS PATLSLSPGE RATLSCRASQ SVSS YLAWY QQKPGQAPRL
69 L10_germl_VL EIVMTQS PPTLSLSPGE RVTLSCRASQ SVSSSYLTWY QQKPGQAPRL
70 L25_geml_VL EIVMTQS PATLSLSPGE RATLSCRASQ SVSSSYLSWY QQKPGQAPRL
16 5T4_VL SIVMTQT PTFLLVSAGD RVTITCKASQ SVSN DVAWY QQKPGQSPTL
65 L16_germline LIYGASTRAT GIPARFSGSG SGTEFTLTIS SLQSEDFAVY YCQQYNNWPP TV
66 L2_germline_ LIYGASTRAT GIPARFSGSG SGTEFTLTIS SLQSEDFAVY YCQQYNNWP
67 A27_germl_VL LIYGASSRAT GIPDRFSGSG SGTDFTLTIS RLEPEDFAVY YCQQYGSSP
68 L6_germl_VL LIYDASNRAT GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQQRSNWP
69 L10_germl_VL LIYGASTRAT SIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFAVY YCQQDNNLP
70 L25_geml_VL LIYGASTRAT GIPARFSGSG SGTDFTLTIS SLQPEDFAVY YCQQDYNLP
16 5T4_VL_publi LISYTSSRYA GVPDRFIGSG YGTDFTFTIS TLQAEDLAVY FCQQDYNSPP TFGGGTKLEI K

OR110

FIG 20

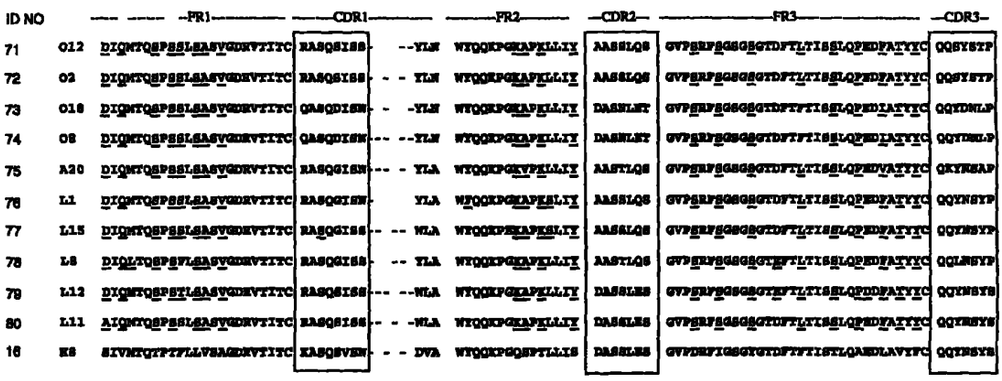

ID NO
FR1
CDR1
FR2
CDR2
FR3
CDR3
71 O12 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISS--YLN WYQQKPGKAPKLLIY AASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSYSTP
72 O2 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISS---YLN WYQQKPGKAPKLLIY AASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQSYSTP
73 O18 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQDISN--YLN WYQQKPGKAPKLLIY DASNLET GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC QQYDNLP
74 O8 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC QASQDISN---YLN WYQQKPGKAPKLLIY DASNLET GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYYC QQYDNLP
75 A20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGISN---YLA WYQQKPGKVPKLLIY AASTLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC QKYNSAP
76 L1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGISN--YLA WFQQKPGKAPKSLIY AASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYNSYP
77 L15 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQGISS---WLA WYQQKPEKAPKSLIY AASSLQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYNSYP
78 L8 DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC RASQGISS--YLA WYQQKPGKAVKLLIY AASTLQS GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC QQLNSYP
79 L12 DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC RASQSISS---WLA WYQQKPGKAPKLLIY DASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC QQYNSYS
80 L11 AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISS---WLA WYQQKPGKAPKLLIY DASSLES GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQYNSYS
16 K6 SIVMTQTPTFLLVSAGDRVTITC KASQSVSN---DVA WYQQKPGQSPTLLIS DASSLES GVPDRFIGSGYGTDFTFTISTLQAEDLAVYFC QQYDSYS

FIG 21

CDR1
DP75 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMEWVRQAPGQGLEWM
H8 EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMEWVKQSHGKSLEWI
CDR2
DP75
GWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR
H8
GRINPNNGVTLYNQKFKDKAILTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR
CDR3
H8
STMITNYVMDYWGQGTLVTVSS

FIG 22

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	SEQ ID NO
consensus	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT		WVRQAPGQGLEWMG		RVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	49-61
VH1 locus						
1 3 1 02	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	G- YYMH	WVRQAPGQGLEWMG	WINP -NSGGTNYAQKFQG	RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	52
1 3 1 03	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	S YAMH	WVRQAPGQRLEWMG	WIHA GNGNTKYSQKFQG	RVTITKDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	53
1 3 1 08	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	S YDIN	WVRQATGQGLEWMG	WMNP -NSGNTGYAQKFQG	RVTMTRNTSISTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	54
1 2 1 18	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	S YGIS	WVRQAPGQGLEWMG	WISA- YNGNTNYAQKLQG	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	55
1 U 1 24	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLT	E LSMH	WVRQAPGKGLEWMG	GFDP EDGETIYAQKFQG	RVTMTEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT	56
1 3 1 45	QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFT	Y KYLH	WVRQAPGQALEWMG	WITP FNGNTNYAQKFQD	RVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDTAMYYCAR	57
1 3 1 46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	S YYMH	WVRQAPGQGLEWMG	IINP SGGSTSYAQKFQG	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR	58
1 3 1 58	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFT	S SAVQ	WVRQARGQRLEWIG	WIVV- GSGNTNYAQKFQR	RVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAA	59
1 2 1 69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS	S YAIS	WVRQAPGQGLEWMG	GIIP IFGTANYAQKFQG	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	60
1 2 1 e	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS	S YAIS	WVRQAPGQGLEWMG	GIIP IFGTARYAQKFQG	RVTIIADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	61
1 2 1 f	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFT	D YYMH	WVQQAPGKGLEWMG	LVDP -EDGETIYAEKFQG	RVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT	62

FIG 23

```
5T4-H8      EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVKQSHGKSLEWIGR 50
            |||  |||  :  |||||||  |||||||||||||||||:|  |  |||  ||
Hum H8 V3   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGR 50

5T4-H8      INPNNGVTLYNQKFKDKAILTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARST 100
            ||||||||||||||||  |  |  ||||||  ||  |||  ||||||||||
Hum H8 V3   INPNNGVTLYNQKFKDRVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARST 100

5T4-H8      MITNYVMDYWGQVTSVTVSS 120
            ||||||||||  |||  |  |||||
Hum H8 V3   MITNYVMDYWGQGTLVTVSS 120
```

FIG. 24A

Humanized H8 anti-5T4 version 1 VL (nucleotide sequence) (SEQ ID NO:81)

GATATTGTGATGACCCAGTCCCCCGACTCCCTGGCCGTTTCACTGGGAGAGAGGGCC
ACCATAAACTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAACAG
AAGCCAGGGCAGTCCCCTAAGCTGCTCATATCCTATACATCCAGTCGCTACGCTGGA
GTCCCTGATCGCTTCTCCGGCAGTGGATCCGGGACCGATTTCACTCTGACCATCAGC
TCCTTGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTTCTGTCAGCAAGATTATAATTCTCCT
CCCACCTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Humanized H8 anti-5T4 version 1 VL (protein sequence) (SEQ ID NO:17)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLISYTSSRYAG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIK

Humanized H8 anti-5T4 VL version 2 (nucleic acid sequence) (SEQ ID NO:22)

GATATTGTGATGACCCAGTCCCCCGACTCCCTGGCCGTTTCACTGGGAGAGAGGGCC
ACCATAAACTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAACAG
AAGCCAGGGCAGCCCCCTAAGCTGCTCATATACTATACATCCAGTCGCTACGCTGGA
GTCCCTGATCGCTTCTCCGGCAGTGGATCCGGGACCGATTTCACTCTGACCATCAGC
TCCTTGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAAGATTATAATTCTCCT
CCCACCTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Humanized H8 anti-5T4 VL version 2 (protein sequence) (SEQ ID NO:23)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQPPKLLIYYTSSRYAG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGGGTKLEIK

FIG. 24B

Humanized H8 anti-5T4 version 1 VH (nucleotide sequence) (SEQ ID NO:82)

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACTACATGCACTGGGTGAAG
CAGAGCCCCGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGACGTATTAATCCTAACAATGGTGTT
ACTCTCTACAACCAGAAATTCAAGGACCGCGTGACCATGACTCGCGACACCTCCATC
TCCACAGCCTACATGGAGCTCTCCCGCCTGCGCTCTGACGACACCGCCGTCTATTAC
TGTGCACGCTCCACTATGATTACCAACTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGCACC
CTGGTCACCGTCTCCTCA

Humanized H8 anti-5T4 version 1 VH (protein sequence) (SEQ ID NO:18)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVKQSPGQGLEWIGRINPNNGV
TLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGT
LVTVSS

Humanized H8 anti-5T4 VH version 2 (nucleotide sequence) (SEQ ID NO:20)

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACTACATGCACTGGGTGCGC
CAGGCCCCCGGACAGGGCCTTGAGTGGATGGGACGTATTAATCCTAACAATGGTGTT
ACTCTCTACAACCAGAAATTCAAGGACCGCGTGACCATGACTCGCGACACCTCCATC
TCCACAGCCTACATGGAGCTCTCCCGCCTGCGCTCTGACGACACCGCCGTCTATTAC
TGTGCACGCTCCACTATGATTACCAACTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGCACC
CTGGTCACCGTCTCCTCA

Humanized H8 anti-5T4 VH version 2 (protein sequence) (SEQ ID NO:21)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNNGV
TLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGT
LVTVSS

FIG. 24C

Humanized H8 anti-5T4 consensus VH (nucleotide sequence) (version 3) (SEQ ID NO:83)

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACTACATGCACTGGGTGCGC
CAGGCCCCCGGACAGGGCCTTGAGTGGATGGGACGTATTAATCCTAACAATGGTGTT
ACTCTCTACAACCAGAAATTCAAGGACCGCGTGACCATCACTCGCGACACCTCCACC
TCCACAGCCTACATGGAGCTCTCCTCCCTGCGCTCTGAGGACACCGCCGTCTATTAC
TGTGCACGCTCCACTATGATTACCAACTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGCACC
CTGGTCACCGTCTCCTCA

Humanized H8 anti-5T4 consensus VH (version 3) (protein sequence) (SEQ ID NO:19)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNNGV
TLYNQKFKDRVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGT
LVTVSS

FIG. 25A

BLASTP 2.2.9 [May-01-2004]

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1088082383-11638-133230823059.BLASTQ4

Query=
(107 letters)

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples
1,866,121 sequences; 619,474,291 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the **BLAST FAQs**

Taxonomy reports

Related Structures

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi|229528|prf||751423A protein Len,Bence-Jones	183	1e-45
gi|28848874|gb|AAO47762.1| immunoglobulin kappa light chain...	166	1e-40
gi|15865329|emb|CAC82418.1| immunoglobulin kappa chain [Mus...	164	3e-40
gi|52181|emb|CAA26585.1| (K)L-chain precursor [Mus musculus]	164	4e-40
gi|21669429|dbj|BAC01739.1| immunoglobulin kappa light chai...	164	4e-40
gi|1336702|gb|AAB35975.1| anti-human apolipoprotein E Ig li...	164	4e-40
gi|644862|gb|AAA62143.1| anti-alpha 4 integrin immunoglobul...	164	5e-40
gi|125834|sp|P06314|KV4C_HUMAN IG KAPPA CHAIN V-IV REGION B...	164	5e-40
gi|90847|pir||S04577 Ig kappa chain precursor V region (MRL...	164	5e-40
gi|2906110|gb|AAC04541.1| monoclonal antibody kappa light c...	164	6e-40

Alignments

>gi|28848874|gb|AAO47762.1| immunoglobulin kappa light chain VKJ region [Homo sapiens]
Length = 133

Score = 166 bits (419), Expect = 1e-40
Identities = 91/113 (80%), Positives = 99/113 (87%), Gaps = 6/113 (5%)

```
Query: 1   DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSV-------SNDVAWYQQKPGQSPKLLISYTSSR 54
            DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK+SQSV       N +AWYQQKPGQ PKLLI + S+R
Sbjct: 21  DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR 80

Query: 55  YAGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIK 107
             +GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY+CQQ Y++PPTFG GTKLEIK
Sbjct: 81  ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPPTFGQGTKLEIK 133
```

FIG. 25B

BLASTP 2.2.9 [May-01-2004]

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1088082880-19567-140480776673.BLASTQ4

Query=
(120 letters)

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples
1,866,121 sequences; 619,474,291 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the **BLAST FAQs**

Taxonomy reports

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi|1616791|gb|AAB16857.1| immunoglobulin IgM heavy chain VH....	191	3e-48
gi|25908406|gb|AAN76129.1| antibody heavy chain variable re...	189	1e-47
gi|4836342|gb|AAD30415.1| immunoglobulin heavy chain variab...	188	3e-47
gi|3171243|gb|AAC18394.1| immunoglobulin heavy chain variab...	188	3e-47
gi|392715|gb|AAA17973.1| immunoglobulin heavy chain variabl...	188	3e-47
gi|21669997|dbj|BAC02008.1| immunoglobulin heavy chain VHDJ...	188	3e-47
gi|4456564|emb|CAB37164.1| immunoglobulin heavy chain varia...	188	3e-47
gi|19848552|gb|AAL17962.1| immunoglobulin heavy chain varia...	187	6e-47
gi|21670201|dbj|BAC02110.1| immunoglobulin heavy chain VHDJ...	186	8e-47
gi|392762|gb|AAA17848.1| immunoglobulin heavy chain variabl...	186	1e-46

Alignments

>gi|1616791|gb|AAB16857.1| immunoglobulin IgM heavy chain VH1 region [Homo sapiens]
Length = 139

Score = 191 bits (486), Expect = 3e-48
Identities = 100/121 (82%), Positives = 109/121 (90%), Gaps = 1/121 (0%)

```
Query: 1   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVKQSPGQGLEWIGRINPNNGVTLY 60
           QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY+FTGYYMHWV+Q+PGQGLEW+G INPN+G T Y
Sbjct: 1   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNY 60

Query: 61  NQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARST-MITNYVMDYWGQGTLVTVS 119
            QKF+ RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR   ++  +  DYWGQGTLVTVS
Sbjct: 61  AQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAREQWLVLEHYFDYWGQGTLVTVS 120

Query: 120 S 120
           S
Sbjct: 121 S 121
```

FIG. 25C

BLASTP 2.2.9 [May-01-2004]

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1088084353-11915-141811327241.BLASTQ4

Query=
(120 letters)

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples
1,866,121 sequences; 619,474,291 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the BLAST FAQs

Taxonomy reports

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi|1616791|gb|AAB16857.1| immunoglobulin IgM heavy chain VH....	195	2e-49
gi|25988406|gb|AAN76129.1| antibody heavy chain variable re...	192	1e-48
gi|21669997|dbj|BAC02008.1| immunoglobulin heavy chain VHDJ...	191	3e-48
gi|392715|gb|AAA17973.1| immunoglobulin heavy chain variabl...	191	3e-48
gi|3171243|gb|AAC18394.1| immunoglobulin heavy chain variab...	191	3e-48
gi|4456564|emb|CAB37164.1| immunoglobulin heavy chain varia...	191	4e-48
gi|19848552|gb|AAL17962.1| immunoglobulin heavy chain varia...	191	5e-48
gi|21670201|dbj|BAC02110.1| immunoglobulin heavy chain VHDJ...	190	6e-48
gi|392762|gb|AAA17848.1| immunoglobulin heavy chain variabl...	190	7e-48
gi|4836342|gb|AAD30415.1| immunoglobulin heavy chain variab...	190	7e-48

Alignments

>gi|1616791|gb|AAB16857.1| immunoglobulin IgM heavy chain VH1 region [Homo sapiens]
Length = 139

Score = 195 bits (496), Expect = 2e-49
Identities = 103/121 (85%), Positives = 109/121 (90%), Gaps = 1/121 (0%)

```
Query: 1   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNNGVTLY 60
           QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY+FTGYYMHWVRQAPGQGLEWMG INPN+G T Y
Sbjct: 1   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNY 60

Query: 61  NQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARST-MITNYVMDYWGQGTLVTVS 119
            QKF+ RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR   ++  +  DYWGQGTLVTVS
Sbjct: 61  AQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAREQWLVLEHYFDYWGQGTLVTVS 120

Query: 120 S 120
           S
Sbjct: 121 S 121
```

FIG. 25D

BLASTP 2.2.9 [May-01-2004]

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1088085285-29968-58639772539.BLASTQ4

Query=
(107 letters)

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples
1,866,121 sequences; 619,474,291 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the **BLAST FAQs**

Taxonomy reports

Related Structures

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi|229528|prf||751423A protein Len,Bence-Jones	191	3e-48
gi|28848874|gb|AAO47762.1| immunoglobulin kappa light chain...	173	1e-42
gi|21669429|dbj|BAC01739.1| immunoglobulin kappa light chai...	172	2e-42
gi|125834|sp|P06314|KV4C_HUMAN IG KAPPA CHAIN V-IV REGION B...	171	3e-42
gi|598166|gb|AAA72132.1| immunoglobulin kappa chain variabl...	171	4e-42
gi|125833|sp|P06313|KV4B_HUMAN IG KAPPA CHAIN V-IV REGION J...	170	6e-42
gi|185921|gb|AAA58916.1| Ig kappa-chain V-J1-region precursor	170	9e-42
gi|69765|pir||K4HU17 Ig kappa chain precursor V-IV region (...	169	1e-41
gi|1943728|gb|AAB52414.1| Ig light chain variable domain (H...	169	1e-41
gi|261240|gb|AAB24404.1| immunoglobulin M light chain V reg...	169	1e-41

Alignments

>gi|229528|prf||751423A protein Len,Bence-Jones
Length = 220

Score = 191 bits (486), Expect = 3e-48
Identities = 91/113 (80%), Positives = 100/113 (88%), Gaps = 6/113 (5%)

```
Query: 1   DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSV------SNDVAWYQQKPGQPPKLLIYYTSSR 54
           DIVMTQSP+SLAVSLGERATINCK+SQSV       N +AWYQQKPGQPPKLLIY+ S+R
Sbjct: 1   DIVMTQSPNSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNSKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR 60

Query: 55  YAGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGGGTKLEIK 107
            +GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ Y++P +FG GTKLEIK
Sbjct: 61  ESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYSFGQGTKLEIK 113
```

FIG. 25E

BLASTP 2.2.9 [May-01-2004]

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1088083751-3503-152757984240.BLASTQ4

Query=
(120 letters)

Database: All non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples
1,866,121 sequences; 619,474,291 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the **BLAST FAQs**

Taxonomy reports

Related Structures

Sequences producing significant alignments:		Score (bits)	E Value
gi|17939658|gb|AAH19337.1|	IGHG1 protein [Homo sapiens]	187	5e-47
gi|1616791|gb|AAB16857.1|	immunoglobulin IgM heavy chain VH...	186	1e-46
gi|46254150|gb|AAS86045.1|	immunoglobulin heavy chain [Homo...	184	5e-46
gi|25988406|gb|AAN76129.1|	antibody heavy chain variable re...	184	5e-46
gi|2344918|gb|AAC51689.1|	IgM heavy chain VH1 region precur...	184	6e-46
gi|619758|gb|AAA60338.1|	immunoglobulin mu chain antibody M...	183	7e-46
gi|486871|pir||S36265	Ig heavy chain V region (clone alpha-...	183	8e-46
gi|2344948|gb|AAC51704.1|	IgM heavy chain VH1 region precur...	183	1e-45
gi|4456564|emb|CAB37164.1|	immunoglobulin heavy chain varia...	183	1e-45
gi|185688|gb|AAA58814.1|	immunoglobulin heavy chain	182	1e-45

Alignments

>gi|17939658|gb|AAH19337.1| IGHG1 protein [Homo sapiens]
Length = 464

Score = 187 bits (476), Expect = 5e-47
Identities = 97/120 (80%), Positives = 102/120 (85%), Gaps = 5/120 (4%)

```
Query: 1   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNNGVTLY 60
           QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY+FT YYMHWVRQAPGQGLEWMG INP+ G T Y
Sbjct: 20  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTDY 79

Query: 61  NQKFKDRVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGTLVTVSS 120
            Q F+ RVT+TRDTSTST YMEL+SLRSEDTAVYYCAR       V DYWGQGT VTVSS
Sbjct: 80  AQNFQGRVTMTRDTSTSTVYMELTSLRSEDTAVYYCARIG-----VHDYWGQGTQVTVSS 134
```

FIG. 25F

BLASTN 2.2.9 [May-01-2004]

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1088085478-1302-167097446066.BLASTQ4

Query=

(360 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
2,232,679 sequences; 10,785,813,082 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the **BLAST FAQs**

Taxonomy reports

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value	
gi|47109385|emb|AJ704536.1| Synthetic construct for anti-PL...	200	1e-48	
gi|25988405|gb|AF453216.1| Synthetic construct clone R-03VH...	192	3e-46	
gi|11875739|gb|AF302820.1|AF302820 Homo sapiens isolate 163...	192	3e-46	L
gi|3170764|gb|AF062151.1|AF062151 Homo sapiens clone 45u-26...	192	3e-46	L
gi|3170748|gb|AF062143.1|AF062143 Homo sapiens clone 45u-17...	192	3e-46	L
gi|557922|gb|S71521.1|S71521 Ig VH1=IgM heavy chain [somati...	192	3e-46	
gi|33104|emb|X07448.1|HSIGHV35 Human V35 gene for Ig heavy ...	192	3e-46	L
gi|587288|emb|Z37312.1|HSIGVHC24 H.sapiens rearranged immun...	192	3e-46	
gi|10697073|emb|AJ406653.2|HSA406653 Homo sapiens partial V...	192	3e-46	
gi|15886969|emb|AJ414014.1|HSA414014 Homo sapiens partial m...	192	3e-46	L

FIG. 25G

Alignments

>gi|47109385|emb|AJ704536.1| Synthetic construct for anti-PLAP ScFv antibody, clone GLC4
Length = 732

Score = 200 bits (101), Expect = 1e-48
Identities = 146/161 (90%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 1   caggtccagctggtgcagtctggagccgaggtgaagaagcctggggcttcagtgaaggtg 60
           ||||| ||||||||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct: 1   caggtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcttcagtgaaagtc 60

Query: 61  tcctgcaaggcttctggttactcattcactggctactacatgcactgggtgcgccaggcc 120
           ||||||||||||||||| ||| | ||||| |||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct: 61  tcctgcaaggcttctggatacaccttcaccggctactacatgcactgggtgcgacaggcc 120

Query: 121 cccggacagggccttgagtggatgggacgtattaatcctaa 161
           || ||||| || ||||||||||||||| | ||||||||||
Sbjct: 121 cctggacaagggcttgagtggatgggatggattaatcctaa 161
```

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.76
Identities = 51/61 (83%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 231 cacagcctacatggagctctcccgcctgcgctctgacgacaccgccgtctattactgtgc 290
           |||||||||||| ||||||   | ||||| | ||||| ||||| ||||| ||||||||||
Sbjct: 231 cacagcctacacggagctgagcagcctgggatctgaggacacggccgtgtattactgtgc 290

Query: 291 a 291
           |
Sbjct: 291 a 291
```

FIG. 25H

BLASTN 2.2.9 [May-01-2004]

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1088085738-6717-83306962642.BLASTQ4

Query=

(321 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
2,232,679 sequences; 10,785,813,082 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the **BLAST FAQs**

Taxonomy reports

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi|7769338|gb|AF206032.1|AF206032 Mus musculus hybridoma 16...	309	2e-81
gi|197464|gb|M14360.1|MUSIGKVM Mouse Ig germline kappa-chai...	280	2e-72
gi|5327158|emb|AJ235968.1|MMU235968 Mus musculus IgVk 19-32...	272	4e-70
gi|804922|dbj|D50385.1|MUSIKCVRJ Mus musculus mRNA for immu...	270	2e-69
gi|406254|emb|X70424.1|MMIGLCKA M.musculus mRNA for monoclo...	270	2e-69
gi|1020158|gb|U30233.1|MMU30233 Mus musculus anti-DNA antib...	268	6e-69
gi|1870335|gb|U55610.1|MMU55610 Mus musculus anti-DNA immun...	266	2e-68
gi|1419647|emb|Z75765.1|MMZ75765 M.musculus mRNA immunoglob...	264	1e-67
gi|235116|gb|S60946.1|S60946 mAb BA.N4:4.57 V kappa region ...	264	1e-67
gi|474312|dbj|D29771.1|MUSVRIKCB Mus musculus mRNA for immu...	262	4e-67

FIG. 25I

Alignments

>gi|7769338|gb|AF206032.1|AF206032 Mus musculus hybridoma 16B2-A1 anti-myosin immunoglobulin light chain variable region mRNA, partial cds
Length = 297

Score = 309 bits (156), Expect = 2e-81
Identities = 237/264 (89%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 58  accataaactgcaaggccagtcagagtgtgagtaatgatgtggcttggtaccaacagaag 117
           ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct: 34  accataacctgcaaggccagtcagagtgtgagtaatgatgtagcttggtaccaacagaag 93

Query: 118 ccagggcagccccctaagctgctcatatactatacatccagtcgctacgctggagtccct 177
           ||||||||| | ||||| ||||| ||||||||| ||||||| ||||||| ||||||||||
Sbjct: 94  ccagggcagtctcctaaactgctgatatactatgcatccaatcgctacactggagtccct 153

Query: 178 gatcgcttctccggcagtggatccgggaccgatttcactctgaccatcagctccttgcag 237
           ||||||||| | |||||||||| ||||| ||||||||| | ||||||||| |  |||||
Sbjct: 154 gatcgcttcactggcagtggatatgggacggatttcactttcaccatcagcactgtgcag 213

Query: 238 gctgaagacgtggcagtttattactgtcagcaagattataattctcctcccaccttcggt 297
           ||||||||| |||||||||||| ||||||||| ||||||| |||||||  || |||||||
Sbjct: 214 gctgaagacctggcagtttatttctgtcagcaggattatagctctcctcggacgttcggt 273

Query: 298 ggaggcaccaagctggaaatcaaa 321
           |||||||||||||||||||||||
Sbjct: 274 ggaggcaccaagctggaaatcaaa 297
```

FIG. 25J

BLASTN 2.2.9 [May-01-2004]

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1093542606-6137-11627181607.BLASTQ4

Query=

(321 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

2,568,353 sequences; 11,601,399,943 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the **BLAST FAQs**

Taxonomy reports

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value	
gi|7769338|gb|AF206032.1|AF206032 Mus musculus hybridoma 16...	317	8e-84	U
gi|197464|gb|M14360.1|MUSIGKVM Mouse Ig germline kappa-chai...	287	7e-75	U
gi|50300847|gb|AY591620.1| Mus musculus clone IgK19-32 immu...	280	2e-72	
gi|5327158|emb|AJ235968.1|MMU235968 Mus musculus IgVk 19-32...	280	2e-72	
gi|804922|dbj|D50385.1|MUSIKCVRJ Mus musculus mRNA for immu...	278	7e-72	U
gi|406254|emb|X70424.1|MMIGLCKA M.musculus mRNA for monoclo...	278	7e-72	U
gi|1020158|gb|U30233.1|MMU30233 Mus musculus anti-DNA antib...	276	3e-71	U
gi|1870335|gb|U55610.1|MMU55610 Mus musculus anti-DNA immun...	274	1e-70	U
gi|1419647|emb|Z75765.1|MMZ75765 M.musculus mRNA immunoglob...	272	4e-70	U
gi|235116|gb|S60946.1|S60946 mAb BA.N4:4.57 V kappa region ...	272	4e-70	

FIG. 25K

Alignments

>gi|7769338|gb|AF206032.1|AF206032 Mus musculus hybridoma 16B2-A1 anti-myosin immunoglobulin light chain variable region mRNA, partial cds
Length = 297

Score = 317 bits (160), Expect = 8e-84
Identities = 238/264 (90%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 58  accataaactgcaaggccagtcagagtgtgagtaatgatgtggcttggtaccaacagaag 117
           ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct: 34  accataacctgcaaggccagtcagagtgtgagtaatgatgtagcttggtaccaacagaag 93

Query: 118 ccagggcagtcccctaagctgctcatatcctatacatccagtcgctacgctggagtccct 177
           |||||||||||| ||||| ||||| |||| |||| |||||| ||||||| ||||||||||
Sbjct: 94  ccagggcagtctcctaaactgctgatatactatgcatccaatcgctacactggagtccct 153

Query: 178 gatcgcttctccggcagtggatccgggaccgatttcactctgaccatcagctccttgcag 237
           ||||||||| |·|||||||||||  |||||| ||||||||| | |||||||||·|  |||||
Sbjct: 154 gatcgcttcactggcagtggatatgggacggatttcactttcaccatcagcactgtgcag 213

Query: 238 gctgaagacgtggcagtttatttctgtcagcaagattataattctcctcccaccttcggt 297
           ||||||||| ||||||||||||||||||||| ||||||| ||||||| || ||||||
Sbjct: 214 gctgaagacctggcagtttatttctgtcagcaggattatagctctcctcggacgttcggt 273

Query: 298 ggaggcaccaagctggaaatcaaa 321
           |||||||||||||||||||||||
Sbjct: 274 ggaggcaccaagctggaaatcaaa 297
```

150

FIG. 25L

BLASTN 2.2.9 [May-01-2004]

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1093542955-7329-189112109965.BLASTQ4

Query=

(360 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

2,568,353 sequences; 11,601,399,943 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the **BLAST FAQs**

Taxonomy reports

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi|34539549|gb|AY369876.1| Mus musculus clone BaPFO-17 immu...	232	4e-58
gi|3561043|gb|AF083186.1|AF083186 Mus musculus anti-HIV-1 p...	232	4e-58
gi|11611972|gb|AF303833.1|AF303833 Mus musculus clone J558....	224	1e-55
gi|27501837|gb|AY172007.1| Mus musculus clone L2MZB-18.8 im...	220	2e-54
gi|1050265|gb|L48675.1|MUSAF Mus musculus (cell line C3H/F2...	220	2e-54
gi|694014|gb|U20060.1|MMU20060 Mus musculus anti-DNA antibo...	220	2e-54
gi|194590|gb|M33558.1|MUSIGHAANA Mouse Ig rearranged gamma-...	220	2e-54
gi|9081896|gb|AF162710.1|AF162710 Synthetic construct singl...	216	3e-53
gi|11611990|gb|AF303842.1|AF303842 Mus musculus clone J558....	214	1e-52
gi|7529620|emb|AJ277214.1|MMU277214 Mus musculus partial mR...	214	1e-52

FIG. 25M

Alignments

>gi|34539549|gb|AY369876.1| Mus musculus clone BaPFO-17 immunoglobulin mu heavy chain variable region mRNA, partial cds
Length = 330

Score = 232 bits (117), Expect = 4e-58
Identities = 150/161 (93%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 36  gaagcctggggcttcagtgaaggtgtcctgcaaggcttctggttactcattcactggcta 95
           ||||||||||||||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 12  gaagcctggggcttcagtgaagatatcctgcaaggcttctggttactcattcactggcta 71

Query: 96  ctacatgcactgggtgaagcagagccccggacagggccttgagtggattggacgtattaa 155
           |||||||||||||||||||||||||||  ||| || ||||||||||||||||||| ||||
Sbjct: 72  ctacatgcactgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtggattggacgtgttaa 131

Query: 156 tcctaacaatggtgttactctctacaaccagaaattcaagg 196
           ||||||||||||| ||||  |||||||||||| |||||||
Sbjct: 132 tcctaacaatggtggtactagctacaaccagaagttcaagg 172
```

Score = 54.0 bits (27), Expect = 2e-04
Identities = 39/43 (90%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 318 tatggactactggggtcaaggcaccctggtcaccgtctcctca 360
           |||||||||||||||||||| |||   ||||||||||||||
Sbjct: 288 tatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca 330
```

FIG. 25N

BLASTN 2.2.9 [May-01-2004]

Reference:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1093543096-23529-46137698074.BLASTQ4

Query=

(360 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

2,568,353 sequences; 11,601,399,943 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the **BLAST FAQs**

Taxonomy reports

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value	
gi|47109385|emb|AJ704536.1| Synthetic construct for anti-PL...	200	1e-48	
gi|25988405|gb|AF453216.1| Synthetic construct clone R-03VH...	192	4e-46	
gi|11875739|gb|AF302820.1|AF302820 Homo sapiens isolate 163...	192	4e-46	U
gi|3170764|gb|AF062151.1|AF062151 Homo sapiens clone 45u-26...	192	4e-46	U
gi|3170748|gb|AF062143.1|AF062143 Homo sapiens clone 45u-17...	192	4e-46	U
gi|557922|gb|S71521.1|S71521 Ig VH1-IgM heavy chain (somati...	192	4e-46	
gi|33104|emb|X07448.1|HSIGHV35 Human V35 gene for Ig heavy ...	192	4e-46	L
gi|587288|emb|Z37312.1|HSIGVHC24 H.sapiens rearranged immun...	192	4e-46	
gi|10697073|emb|AJ406653.2|HSA406653 Homo sapiens partial V...	192	4e-46	
gi|15886969|emb|AJ414014.1|HSA414014 Homo sapiens partial m...	192	4e-46	U

FIG. 25O

Alignments

>gi|47109385|emb|AJ704536.1| Synthetic construct for anti-PLAP ScFv antibody, clone GLC4

Length = 732

Score = 200 bits (101), Expect = 1e-48
Identities = 146/161 (90%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 1   caggtccagctggtgcagtctggagccgaggtgaagaagcctggggcttcagtgaaggtg 60
           ||||| ||||||||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct: 1   caggtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcttcagtgaaagtc 60

Query: 61  tcctgcaaggcttctggttactcattcactggctactacatgcactgggtgcgccaggcc 120
           ||||||||||||||||| ||| | ||||| ||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct: 61  tcctgcaaggcttctggatacaccttcaccggctactacatgcactgggtgcgacaggcc 120

Query: 121 cccggacagggccttgagtggatgggacgtattaatcctaa 161
           || ||||| || ||||||||||||||| | ||||||||||
Sbjct: 121 cctggacaagggcttgagtggatgggatggattaatcctaa 161
```

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.21
Identities = 28/30 (93%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 262 tctgaggacaccgccgtctattactgtgca 291
           |||||||||||| ||||| ||||||||||||
Sbjct: 262 tctgaggacacggccgtgtattactgtgca 291
```

FIG. 26A

Human IgG4_mutated (hinge mutation S241P) (SEQ ID NO:24)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Human IgG1 (SEQ ID NO:25)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Human IgG1 (L234A, G237A) (SEQ ID NO:85)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PEALGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Human IgG1 (L234A, L235A) (SEQ ID NO:86)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 26B

Human IgG1 (L235A, G237A) (SEQ ID NO:87)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Human IgG1 (L234A, L235A, G237A) (SEQ ID NO:88)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Human IgG1 (N297A) (SEQ ID NO:89)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Human Kappa (SEQ ID NO:26)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 27A

Chimeric H8 (hIgG1/huKappa)

Murine 5T4-H8 VL and human Kappa (SEQ ID NO:1)

SIVMTQTPTFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPTLLISYTSSRYAG
VPDRFIGSGYGTDFTFTISTLQAEDLAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Murine 5T4-H8 VH and human IgG1 (SEQ ID NO:2)

EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVKQSHGKSLEWIGRINPNNGV
TLYNQKFKDKAILTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMITNYVMDYWGQVT
SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP.
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 27B

Chimeric H8 (hIgG4 mut/huKappa)

Murine 5T4-H8 VL and human Kappa (SEQ ID NO:3)

SIVMTQTPTFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPTLLISYTSSRYAG
VPDRFIGSGYGTDFTFTISTLQAEDLAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Murine 5T4-H8 VH and human IgG4_mutated (SEQ ID NO:4)

EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVKQSHGKSLEWIGRINPNNGV
TLYNQKFKDKAILTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMITNYVMDYWGQVT
SVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

FIG. 27C

Semi-humanized H8 (muVH/huVL1)

Humanized 5T4-H8 VL (version 1) and human Kappa (SEQ ID NO:5)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLISYTSSRYAG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Murine 5T4-H8 VH and human IgG4_mutated (SEQ ID NO:6)

EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVKQSHGKSLEWIGRINPNNGV
TLYNQKFKDKAILTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMITNYVMDYWGQVT
SVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

FIG. 27D

Humanized H8 (Version 1)

Humanized 5T4-H8 VL (version 1) and human Kappa (SEQ ID NO:7)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLISYTSSRYAG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Humanized 5T4-H8 VH (version 1) and human IgG4_mutated (SEQ ID NO:8)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVKQSPGQGLEWIGRINPNNGV
TLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

FIG. 27E

Humanized H8 (Version 2/1)

Humanized 5T4-H8 VL (version 1) and human Kappa (SEQ ID NO:9)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLISYTSSRYAG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Humanized 5T4-H8 VH (CDR grafted) and human IgG4_mutated (SEQ ID NO:10)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNNGV
TLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

FIG. 27F

Humanized anti-5T4 version 2

Humanized 5T4-H8 VL (CDR grafted) and human Kappa (SEQ ID NO:11)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQPPKLLIYYTSSRYAG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Humanized 5T4-H8 VH (CDR grafted) and human IgG4_mutated (SEQ ID NO:12)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNNGV
TLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

142

FIG. 27G

Humanized anti-5T4 version 3

Humanized 5T4-H8 VL (CDR grafted) and human Kappa (SEQ ID NO:11)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQPPKLLIYYTSSRYAG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Humanized 5T4-H8 VH (version 3) and human IgG4_mutated (SEQ ID NO:84)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNNGV
TLYNQKFKDRVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

FIG. 28A

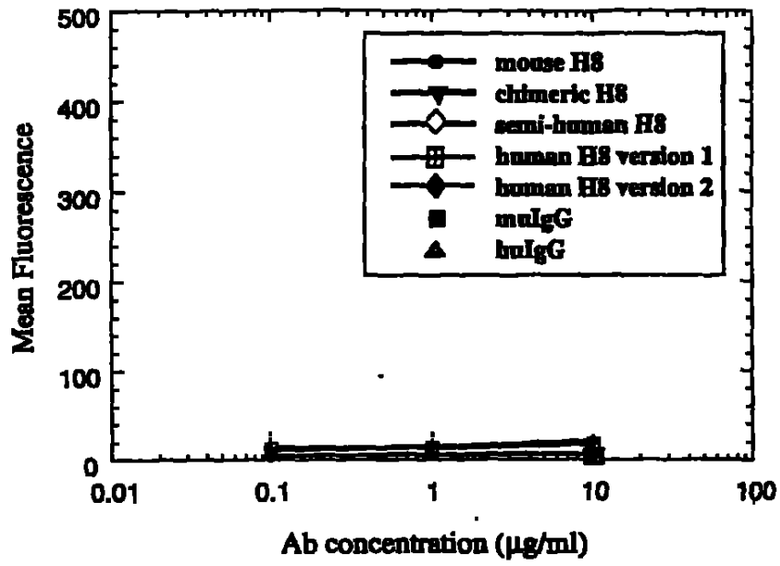


FIG. 28B

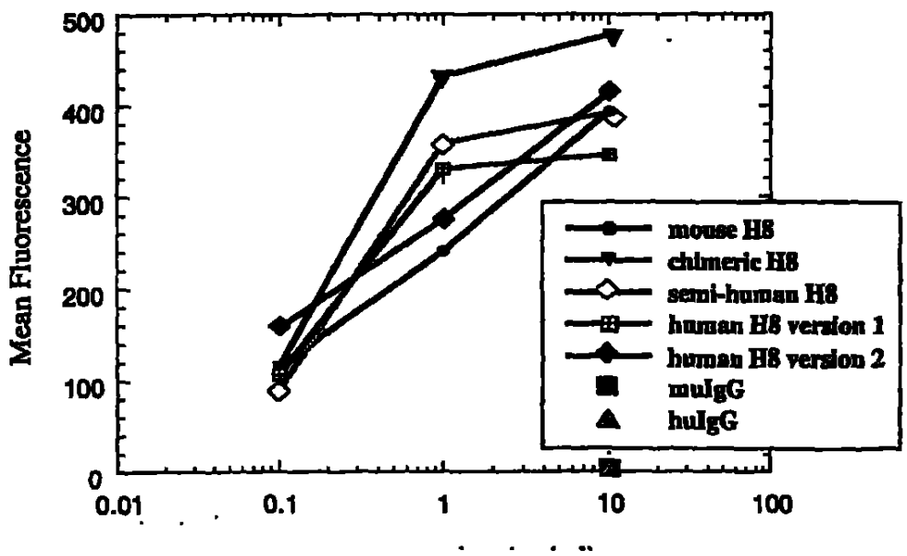


FIG. 29

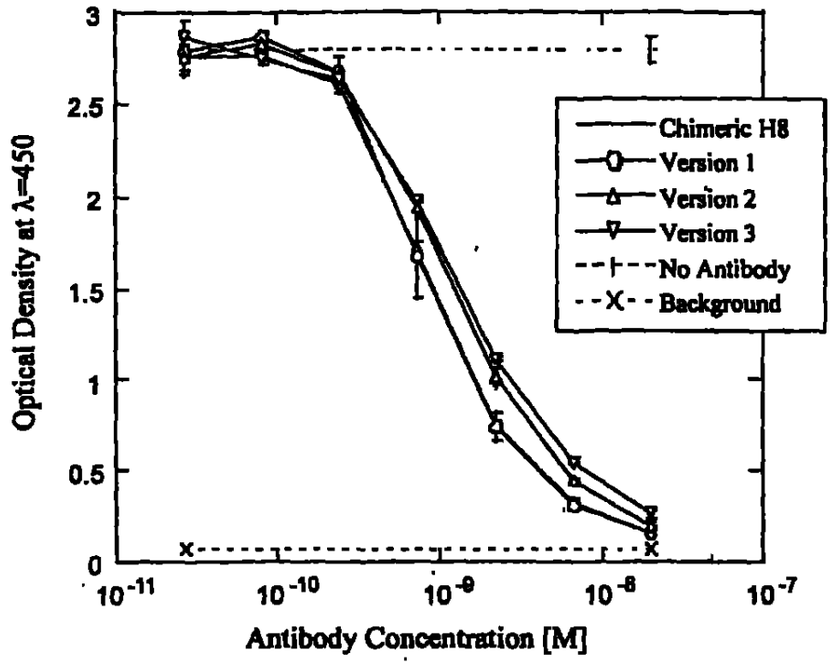

Optical Density at λ=450
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
10^-11
10^-10
10^-9
10^-8
10^-7
Antibody Concentration [M]
Chimeric H8
Version 1
Version 2
Version 3
No Antibody
Background

FIG. 30

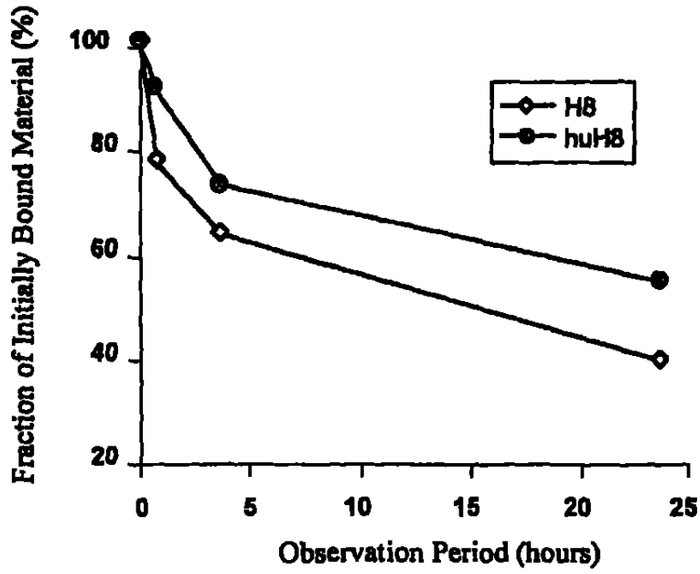

Fraction of Initially Bound Material (%)
100
80
60
40
20
0
5
10
15
20
25
Observation Period (hours)
H8
huH8

FIG. 31

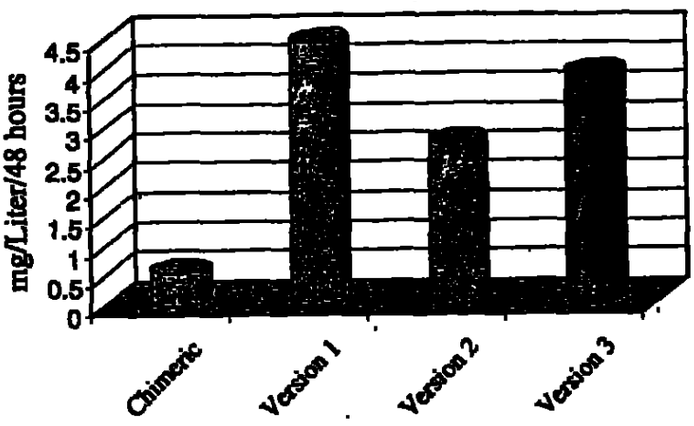

mg/Liter/48 hours
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Chimeric
Version 1
Version 2
Version 3

FIG. 32A

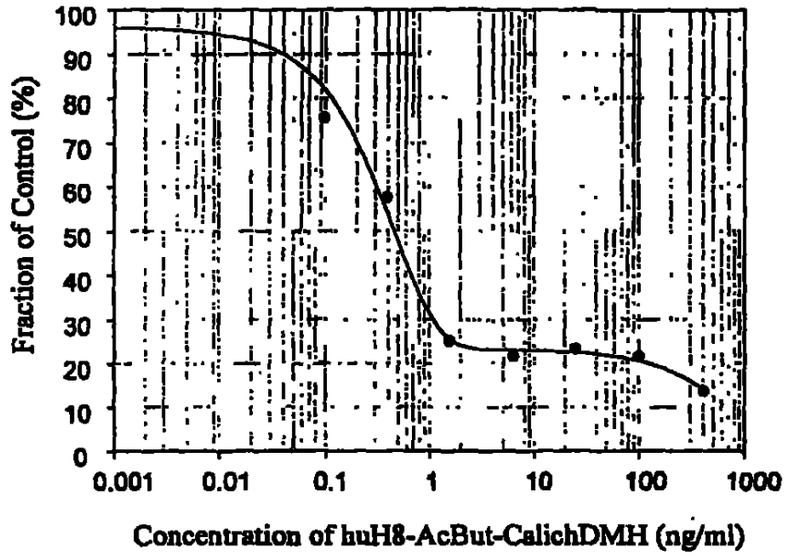


FIG. 32B

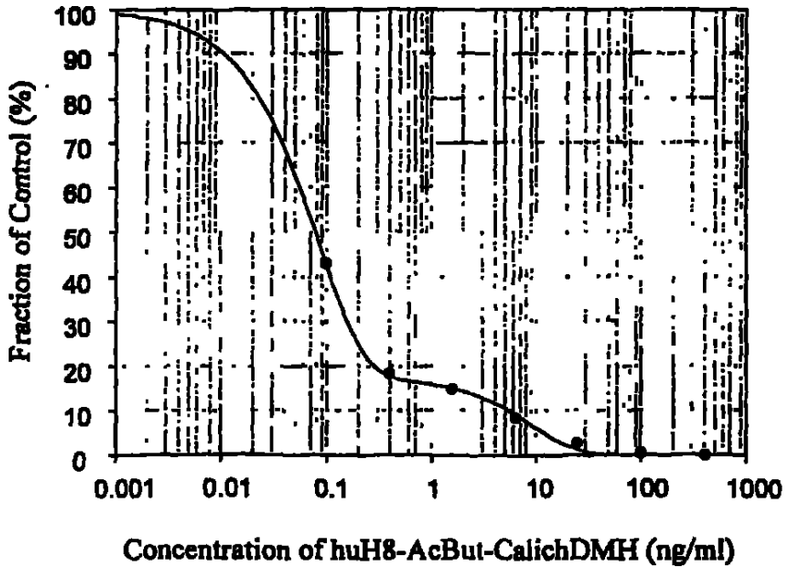


FIG 33A

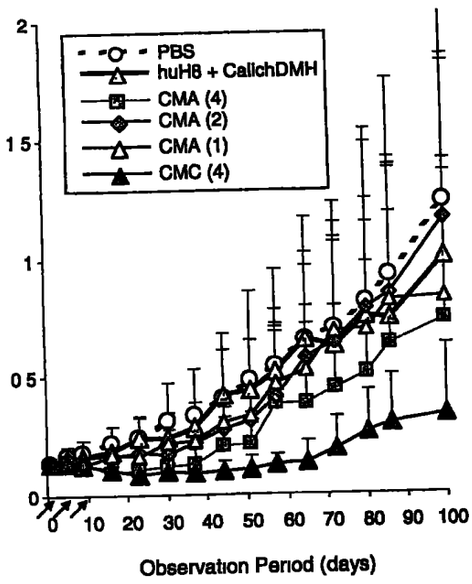


FIG 33B

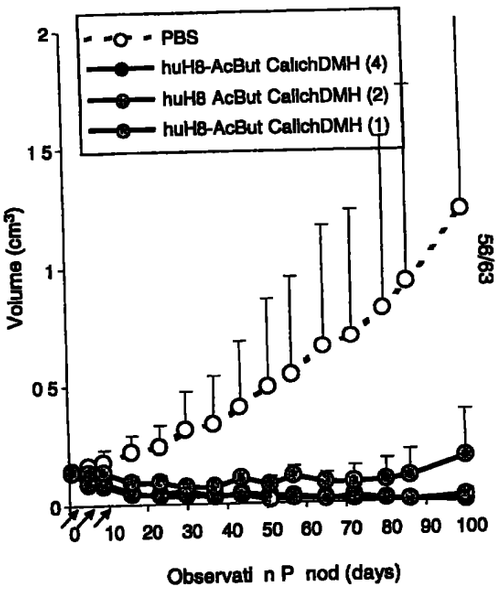


FIG 33C

100
80
60
40
20
0
CR
PR
NR
D
E
H
I
A huH8-AcBut CalichDMH (4)
B huH8-AcBut-CalichDMH (2)
C huH8-AcBut-CalichDMH (1)
D PBS
E huH8 + CalichDMH
F CMA (4)
G CMA (2)
H CMA (1)
I CMC (4)

FIG 34A

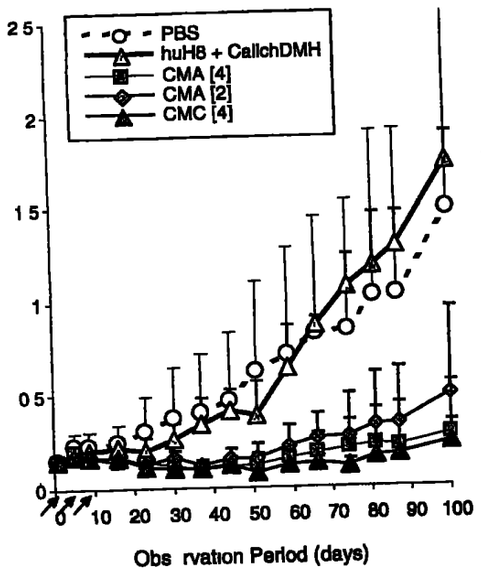


FIG 34B

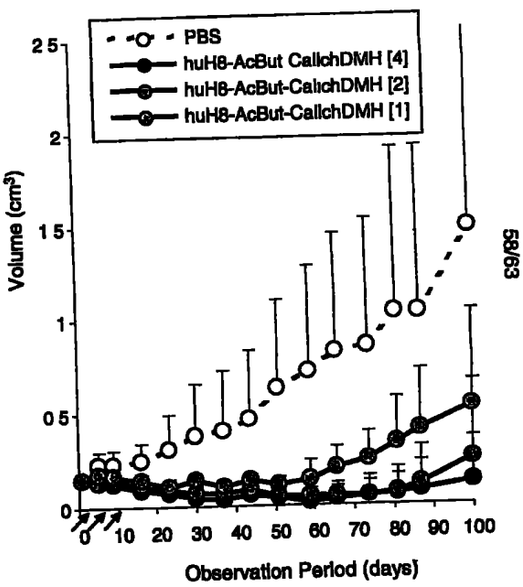


FIG 34C

WO 2006/031653

PCT/US2005/032196

FIG 35A

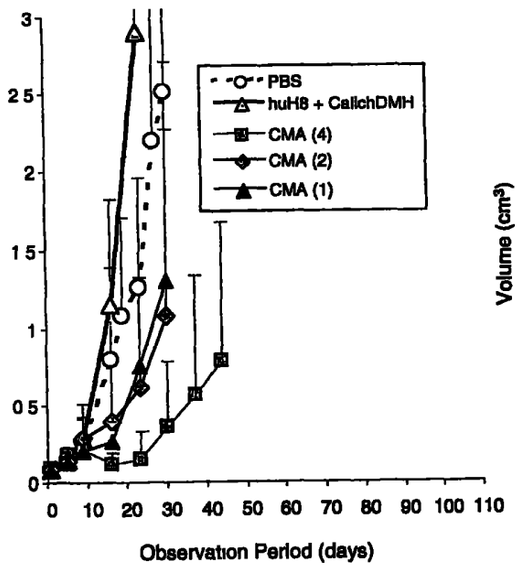
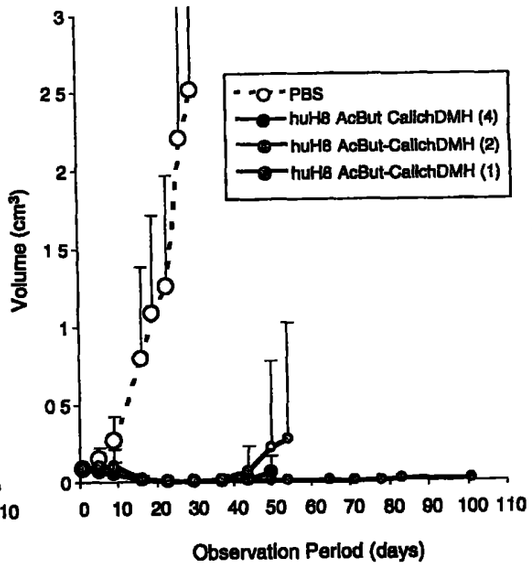


FIG 35B



WO 2006/031643 PCT/US2005/032196

0150

FIG 35C

100
80
60
40
20
0
CR
PR
NR
A
B
C
D
E
F
G
H
huH8-AcBut-CalichDMH (4)
huH8-AcBut CalichDMH (2)
huH8-AcBut-CalichDMH (1)
PBS
huH8 + CalichDMH
CMA (4)
CMA (2)
CMA (1)

FIG 35D

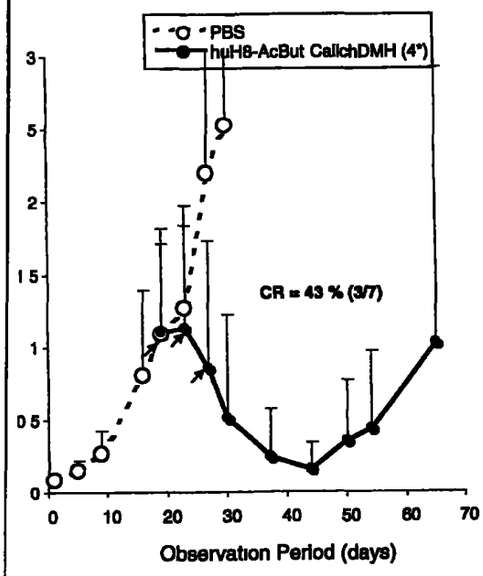


FIG 35E

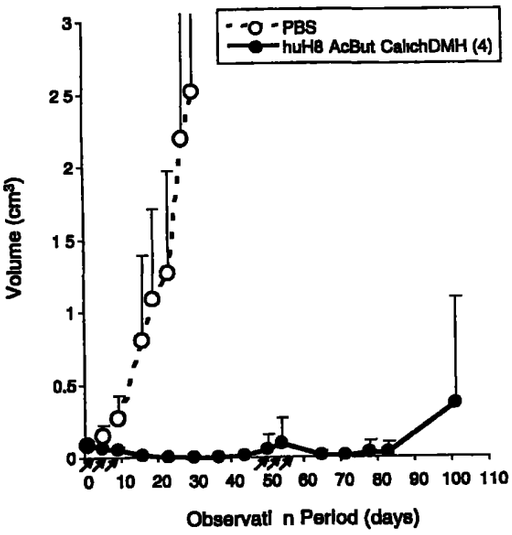


FIG 36A

FIG 36B

PCT/US05/32196

SEQUENCE LISTING

<110> Wyeth

<120> HUMANIZED ANTI-5T4 ANTIBODIES AND ANTI-5T4/CALICHEAMICIN CONJUGATES

<130> 040000-0317753

<160> 89

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> light chain variable region

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125
```

PCT/US05/32196

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 2
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> heavy chain variable region

<400> 2

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

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

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Val Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

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

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

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

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

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

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

PCT/US05/32196

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

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

Gly Lys
450

<210> 3
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> light chain variable region

<400> 3

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

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

PCT/US05/32196

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 4
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> heavy chain variable region

<400> 4

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

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

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45

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

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

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Val Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
    130                 135                 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
        195                 200                 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
    210                 215                 220

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

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

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

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

<210> 5
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

[redacted]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> light chain variable region

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

PCT/US05/32196

<210> 6
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> heavy chain variable region

<400> 6

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

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

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Val Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

PCT/US05/32196

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

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

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

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

<210> 7
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> light chain variable region

<400> 7

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 8
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> heavy chain variable region

<400> 8

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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

PCT/US05/32196

```
Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
    130                 135                 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
        195                 200                 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
    210                 215                 220

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
            260                 265                 270

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

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

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

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
                325                 330                 335
```

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

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

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

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

<210> 9
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequance is derived from mouse and human antibody sequences

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> light chain variable region

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 10
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> heavy chain variable region

<400> 10

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

PCT/US05/32196

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

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

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

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

<210> 11
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(107)
<223> light chain variable region

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(34)
<223> CDR 1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(56)
<223> CDR 2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (89)..(97)
<223> CDR3

<400> 11

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 12
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(120)
<223> heavy chain variable region

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (26)..(35)
<223> CDR1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDR2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(109)
<223> CDR3

<400> 12

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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

PCT/US05/32196

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

PCT/US05/32196

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

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

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

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

<210> 13
<211> 417
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 13
atggaatgga gctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccactctgag 60

gtccagctgc agcagtctgg acctgacctg gtgaagcctg gggcttcagt gaagatatcc 120

tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tactacatgc actgggtgaa gcagagccat 180

ggaaagagcc ttgagtggat tggacgtatt aatcctaaca atggtgttac tctctacaac 240

cagaaattca aggacaaggc catattaact gtagacaagt catccaccac agcctacatg 300

gagctccgca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atctactatg 360

attacgaact atgttatgga ctactggggt caagtaacct cagtcaccgt ctcctca 417

<210> 14
<211> 139
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(19)

PCT/US05/32196

<223> leader sequence

<220>
<221> MATURE_PEPTIDE
<222> (20)..(139)

<400> 14

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Val Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 15
<211> 381
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 15
atgaagtcac agacccaggt cttcgtattt ctactgctct gtgtgtctgg tgcgcatggg 60

agtattgtga tgacccagac tcccacattc ctgcttgttt cagcaggaga cagggttacc 120

ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca acagaagcca 180

gggcagtctc ctacactgct catatcctat acatccagtc gctacgctgg agtccctgat 240

cgcttcattg gcagtggata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tttgcaggct 300

gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcaa gattataatt ctcctccgac gttcggtgga 360

ggcaccaagc tggaaatcaa a 381

<210> 16
<211> 127
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(20)
<223> leader sequence

<220>
<221> MATURE_PEPTIDE
<222> (21)..(127)

<400> 16

Met Lys Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Leu Leu Leu Cys Val Ser
1 5 10 15

Gly Ala His Gly Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Thr Phe Leu Leu
20 25 30

Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Thr Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Ser Arg Tyr Ala Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Ile Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
85 90 95

Thr Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr
100 105 110

Asn Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequence

PCT/US05/32196

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<400> 18

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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<400> 19

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<400> 20
caggtccagc tggtgcagtc tggagccgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggctactaca tgcactgggt gcgccaggcc 120

cccggacagg gccttgagtg gatgggacgt attaatccta acaatggtgt tactctctac 180

aaccagaaat tcaaggaccg cgtgaccatg actcgcgaca cctccatctc cacagcctac 240

atggagctct ccgcctgcg ctctgacgac accgccgtct attactgtgc acgctccact 300

atgattacca actatgttat ggactactgg ggtcaaggca ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 21
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<400> 21

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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22

PCT/US05/32196

<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<400> 22
gatattgtga tgacccagtc ccccgactcc ctggccgttt cactgggaga gagggccacc 60

ataaactgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtacca acagaagcca 120

gggcagcccc ctaagctgct catactatat acatccagtc gctacgctgg agtccctgat 180

cgcttctccg gcagtggatc cgggaccgat ttcactctga ccatcagctc cttgcaggct 240

gaagacgtgg cagtttatta ctgtcagcaa gattataatt ctcctcccac cttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

PCT/US05/32196

<210> 24
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

PCT/US05/32196

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 25
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

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

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

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

PCT/US05/32196

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

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

<210> 26
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

PCT/US05/32196

<400> 26

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

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

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

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

<210> 27
<211> 114
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 27
cgcgcactcc gatattgtga tgacccagtc ccccgactcc ctggccgttt cactgggaga 60

gagggccacc ataaactgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttg 114

<210> 28
<211> 117
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 28
gtaccaacag aagccagggc agtcccctaa gctgctcata tcctatacat ccagtcgcta 60

cgctggagtc cctgatcgct tctccggcag tggatccggg accgatttca ctctgac 117

<210> 29
<211> 120
<212> DNA

PCT/US05/32196

<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 29
catcagctcc ttgcaggctg aagacgtggc agtttatttc tgtcagcaag attataattc 60

tcctcccacc ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa cgtgagtaga ataacttaat 120

<210> 30
<211> 105
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 30
taagttattc tactcacgtt tgatttccag cttggtgcct ccaccgaagg tgggaggaga 60

attataatct tgctgacaga aataaactgc cacgtcttca gcctg 105

<210> 31
<211> 116
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 31
caaggagctg atggtcagag tgaaatcggt cccggatcca ctgccggaga agcgatcagg 60

gactccagcg tagcgactgg atgtatagga tatgagcagc ttaggggact gccctg 116

<210> 32
<211> 124
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 32
gcttctgttg gtaccaagcc acatcattac tcacactctg actggccttg cagtttatgg 60

tggccctctc tcccagtgaa acggccaggg agtcgggggg ctgggtcatc acaatatcgg 120

agtg 124

<210> 33
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

PCT/US05/32196

<223> PCR primer

<400> 33
cagccccctа agctgctcat atactat 27

<210> 34
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 34
atagtatatg agcagcttag ggggctg 27

<210> 35
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 35
gtggcagttt attactgtca gcaag 25

<210> 36
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 36
cttgctgaca gtaataaact gccac 25

<210> 37
<211> 86
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 37
cgcgcactcc caggtccagc tggtgcagtc tggagccgag gtgaagaagc ctggggcttc 60

agtgaaggtg tcctgcaagg cttctg 86

<210> 38
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 38
gttactcatt cactggctac tacatgcact gggtgaagca gagccccgga cagggccttg 60

agtggattgg acgtattaat cctaacaatg 90

<210> 39
<211> 101
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 39
gtgttactct ctacaaccag aaattcaagg accgcgtgac catgactcgc gacacctcca 60

tctccacagc ctacatggag ctctccccgc tgcgctctga c 101

<210> 40
<211> 104
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 40
gacaccgccg tctattactg tgcacgctcc actatgatta ccaactatgt tatggactac 60

tggggtcaag gcaccctggt caccgtctcc tcaggtgagt cctg 104

<210> 41
<211> 99
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 41
tcgacaggac tcacctgagg agacggtgac cagggtgcct tgaccccagt agtccataac 60

atagttggta atcatagtgg agcgtgcaca gtaatagac 99

<210> 42
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 42
ggcggtgtcg tcagagcgca ggcgggagag ctccatgtag gctgtggaga tggaggtgtc 60

gcgagtcatg gtcacgcggt ccttgaattt ctg 93

<210> 43
<211> 92
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 43
gttgtagaga gtaacaccat tgttaggatt aatacgtcca atccactcaa ggccctgtcc 60

ggggctctgc ttcacccagt gcatgtagta gc 92

<210> 44
<211> 97
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 44
cagtgaatga gtaaccagaa gccttgcagg acaccttcac tgaagcccca ggcttcttca 60

cctcggctcc agactgcacc agctggacct gggagtg 97

<210> 45
<211> 90
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 45
gttactcatt cactggctac tacatgcact gggtgcgcca ggccccccgga cagggccttg 60

agtggatggg acgtattaat cctaacaatg 90

<210> 46
<211> 92
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 46
gttgtagaga gtaacaccat tgttaggatt aatacgtccc atccactcaa ggccctgtcc 60

gggggcctgg cgcacccagt gcatgtagta gc 92

<210> 47
<211> 101

<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleotide

<400> 47
gtgttactct ctacaaccag aaattcaagg accgcgtgac catcactcgc gacacctcca 60

cctccacagc ctacatggag ctctcctccc tgcgctctga g 101

<210> 48
<211> 93
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> PCR primer

<400> 48
ggcggtgtcc tcagagcgca gggaggagag ctccatgtag gctgtggagg tggaggtgtc 60

gcgagtgatg gtcacgcggt ccttgaattt ctg 93

<210> 49
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> consensus antibody heavy chain framework 1 sequence based on human antibody sequences

<400> 49

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

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

<210> 50
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> consensus antibody heavy chain framework 2 sequence based on human antibody sequences

<400> 50

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 51
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> consensus antibody heavy chain framework 3 sequence based on human antibody sequences

<400> 51

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 52
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 53
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

PCT/US05/32196

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 54
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

PCT/US05/32196

<210> 55
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 56
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
20 25 30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

PCT/US05/32196

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

Ala Thr

<210> 57
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

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

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

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

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

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 58
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

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

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

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

PCT/US05/32196

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 59
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

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

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

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

Gly Trp Ile Val Val Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ala

<210> 60
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 61
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 62
<211> 98

PCT/US05/32196

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

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

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

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

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr

<210> 63
<211> 101
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro
100

<210> 64
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 65
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

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

PCT/US05/32196

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

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

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

Thr Val

<210> 66
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

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

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

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

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

<210> 67
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

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

PCT/US05/32196

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> 68
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

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 Pro
85 90 95

<210> 69
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

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

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

PCT/US05/32196

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp His Asn Leu Pro
85 90 95

<210> 70
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

Glu Ile Val Met 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 Ser
20 25 30

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

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

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

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

<210> 71
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

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

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

PCT/US05/32196

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

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

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

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

<210> 72
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

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

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

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

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

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

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

<210> 73
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro
85 90 95

<210> 74
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro
85 90 95

<210> 75
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

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

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

PCT/US05/32196

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

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

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

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

<210> 76
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

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

<210> 77
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

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

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

PCT/US05/32196

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

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

<210> 78
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

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

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

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

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

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

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

<210> 79
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

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

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

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser
85 90 95

<210> 80
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80

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

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

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

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

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

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

<210> 81
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<400> 81
gatattgtga tgacccagtc ccccgactcc ctggccgttt cactgggaga gagggccacc 60

ataaactgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtacca acagaagcca 120

PCT/US05/32196

gggcagtccc ctaagctgct catatcctat acatccagtc gctacgctgg agtccctgat 180

cgcttctccg gcagtggatc cgggaccgat ttcactctga ccatcagctc cttgcaggct 240

gaagacgtgg cagtttattt ctgtcagcaa gattataatt ctcctcccac cttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 82
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<400> 82
caggtccagc tggtgcagtc tggagccgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggctactaca tgcactgggt gaagcagagc 120

cccggacagg gccttgagtg gattggacgt attaatccta acaatggtgt tactctctac 180

aaccagaaat tcaaggaccg cgtgaccatg actcgcgaca cctccatctc cacagcctac 240

atggagctct cccgcctgcg ctctgacgac accgccgtct attactgtgc acgctccact 300

atgattacca actatgttat ggactactgg ggtcaaggca ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 83
<211> 360
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> artificial sequence is derived from mouse and human antibody sequences

<400> 83
caggtccagc tggtgcagtc tggagccgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggctactaca tgcactgggt gcgccaggcc 120

ccoggacagg gccttgagtg gatgggacgt attaatccta acaatggtgt tactctctac 180

aaccagaaat tcaaggaccg cgtgaccatc actcgcgaca cctccacctc cacagcctac 240

atggagctct cctccctgcg ctctgaggac accgccgtct attactgtgc acgctccact 300

atgattacca actatgttat ggactactgg ggtcaaggca ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 84
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

PCT/US05/32196

<223> Humanized heavy chain with variable region derived from human and mouse and human IgG4 constant region

<400> 84

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

PCT/US05/32196

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

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

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

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

<210> 85
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

PCT/US05/32196

<400> 85

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PCT/US05/32196

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

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

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

<210> 86
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

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

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

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

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

PCT/US05/32196

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

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

<210> 87
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

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

<210> 88
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

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

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

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

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

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

PCT/US05/32196

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

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

<210> 89
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

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

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

PCT/US05/32196

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

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

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

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

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

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

PCT/US05/32196

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

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

ANTICUERPOS ANTI-5T4 HUMANIZADOS Y CONJUGADOS DE ANTICUERPO Anti-5T4/CALIQUEAMICINA

SOLICITUDES RELACIONADAS

Se reivindica autoridad de la solicitud de patente provisional U.S. No. 60/608,494, presentada en septiembre 10, 2004, Se incorporada como referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se relaciona de manera general con anticuerpos humanizados y conjugados de anticuerpos/drogas (es decir inmunoconjugados) para el tratamiento de desordenes malignos. Más particularmente, la presente invención se relaciona con anticuerpos anti-5T4 humanizados, ácidos nucleicos de región variable aislados y polipéptidos para preparar los anticuerpos, y conjugados de anti-5T4/citotóxica, particularmente, conjugados de anti-5T4/caliqueamicina.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los conjugados de droga desarrollados para farmacoterapia sistémica son agentes terapéuticos de blanco específico. El concepto involucra acoplar un agente terapéutico a una molécula portadora con especificidad de unión para una población de células blanco definidas. La disponibilidad de los anticuerpos monoclonales de alta afinidad alentado en desarrollo de las inmunoterapias es decir drogas destinadas a anticuerpos. Los

agentes terapéuticos que han sido conjugados a anticuerpos monoclonales incluyen citotoxinas, modificadores de respuesta biológica, enzimas, (por ejemplo ribonucleasa), proteínas y péptidos inductores de apoptosis, y radioisótopos. Los conjugados de anticuerpo/citotoxina son frecuentemente denominados inmunocitotoxinas, mientras que los conjugados de anticuerpo/droga que consisten de anticuerpos y drogas de bajo peso molecular tales como metotrexato y adriamicina son denominadas conjugados de quimio anticuerpo/droga. Los inmunomodulares contienen modificadores de la respuesta biológica que son conocidos por tener funciones regulatorias tales como linfoquinas, factores del crecimiento, y el factor de veneno de cobra activante de complemento (CVF). Los conjugados de radioanticuerpo/droga consisten de isótopos radioactivos, que se pueden utilizar como terapéuticos para matar células mediante su radiación o ser utilizados para imágenes. El suministro de drogas mediada por anticuerpo a las células tumorales aumente la eficacia de la droga a la muerte tumoral al minimizar su tumo en tejidos normales. Ver, por ejemplo, Ref. *et al.* (2002) *Cancer Control* 9:152-66; Sievers (2000) *Cancer Chemother. Pharmacol.* 46 Suppl:S18-22; Goldenberg (2001) Crit. Rev. Oncol. Hematol. 39:195-201. MYLOTARG® (gemtuzumab ozogamicin) es un conjugado de anticuerpo/droga comercialmente disponible que trabaja de acuerdo a este principio y que es aprobado para el tratamiento de leucemia mieloide aguda en pacientes de edad. Ver Sievers et al. (1999) Blood 93:3678-84. En este caso, la molécula blanco es un anticuerpo monoclonal anti-CD33 que esta conjugado a la caliqueamicina.

La inmunoterapia en humanos ha sido limitada, en parte a las respuestas adversas a los anticuerpos monoclonales no humanos. Ensayos clínicos tempranos que utilizan anticuerpos de roedores revelaron respuestas de anticuerpo antiratón humano (HAMA) y de anticuerpo antirrata humano (HARA), que conducen a una rápida limpieza de anticuerpo. Han sido desarrollados anticuerpos inmunogénicos, que incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos PRIMATIZED®, y anticuerpos humanos preparados utilizando ratones transgénicos o librerías de despliegue de fago. Ver Morrison *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 81:6851-5; Queen et al. (1989) *Proc Natl. Acad. Sci.* USA 86:10029-33; Newman et al. (1992) Biotechnology (NY) 10:1455-60; Green et al. (1994) Nat Genet. 7:13-21; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-97. El evitamiento a la respuesta de HAMA permite una administración de alta dosis y dosis repetida para lograr una respuesta terapéutica.

Los anticuerpos quiméricos se preparan utilizando técnicas de clonación recombinante para incluir regiones variables, las cuales contienen sitios de unión de antígeno, proveniente de anticuerpos de especies no humanas (es decir unas especies inmunizadas con el antígeno) y regiones constantes de una inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanizados son un tipo de anticuerpo quimérico, en donde solamente aquellos residuos de las regiones variables que son responsables por la unión de antígenos se derivan de especies no humanas, aunque el resto de los residuos de región variable así como también la región constante son humanos. Los anticuerpos humanizados son aun menos inmunogénicos que los anticuerpos quiméricos tradicionales y

muestran estabilidad mejorada luego de la administración a los humanos. Benincosa et al. (2000) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292:810-6; Kalofonos et al. (1994) Eur. J. Cancer 30ª:1842-50; Subramanian et al. (1998) *Pediatr. Infect. Dis.* J. 17:110-5.

Los anticuerpos candidato para apuntamiento de droga incluyen anticuerpos que reconocen antígenos oncofetales, es decir, los antígenos presentes sobre las células fetales y las células neoplásicas, y que están grandemente ausentes de las células adultas normales. Ver, por ejemplo, Magdelenat (1992) *J. Immunol. Methods* 150:133-43. Un antígeno oncofetal 5T4 es una glicoproteina de transmembrana altamente glicosilada 72 kDa que comprende un núcleo no glicosilado de 42 kDa (Hole et al. (1988) Br. J. Cancer 57:239-46, Hole et al. (1990) Int. J. Cancer 45:179-84; PCT International Publication No. WO89/07947; U.S. Patent No 5,869,053). El 5T4 incluye un dominio extracelular caracterizado por dos repeticiones ricas en leucina los (LRR) y una región hidrofílica interviniente, que es un antígeno accesible para terapia de blanco (Myers et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9319-24).

El 5T4 humano se expresa en numerosos tipos de cáncer, que incluyen carcinomas de la vejiga, mama, cerviz, endometrio, pulmón, esófago, ovario, páncreas, estómago, y testículos, y esta sustancialmente ausente de tejidos normales excepto para sincitiotrofoblastos en la placenta (Southall et al. (1990) Br. J. Cancer 61:89-95 (immunohistolgical distribution of 5T4 antigen in normal and malignant tissues); Mieke et al. (1997) *Clin. Cancer Res.* 3:1923-1930 (low intercellular adhesión molecule 1

and high 5T4 expression on tumor cells correlate with reduced disease-free survival in colorectal carcinoma patients); Starzynska et al. (1994) *Br. J. Cancer* 69: 899-902 (prognostic significance of 5T4 oncofetal antigen expression in colorectal carcinoma); Starzynska et al. (1992) *Br. J. Cancer* 66:867-869 (expression of 5T4 antigen in colorectal and gastric carcinoma); Jones et al. (1990) Br. J. Cancer 61: 96-100 (expression of 5T4 antigen in cervical cancer); Connor and Stern (199) *Int. J. Cancer* 46:1029-1034 (loss of MHC class-I Expression in cervical carcinomas); Ali et al.. (2001) *Oral Oncology* 37:57-64 (pattern of expression of the 5T4 oncofetal antigen on normal, dysplastic and malignant oral mucosa); PCT International Publication No. WO89/07947; U.S. Patent No. 5,869,053). Por ejemplo, los tejidos reportados por no tener expresión de 5T4 incluyen el hígado, piel, vaso, timo, sistema nervioso central (SNC), glándulas adrenales, y ovarios. Los tejidos reportados por tener expresión focal o baja del 5T4 incluyen el hígado, piel, vaso, nodo linfático, tonsil, tiroides, próstata, y vesículas similares. La expresión difusa moderada débil del 5T4 se ha reportado en el riñón, pulmón, páncreas, faringe, y tracto gastrointestinal. El único tejido reportado por tener alta expresión de 5T4 es el sincitiotrofoblasto; el 5T4 también esta ausente de suero normal o de suero de mujer embarazada (es decir niveles < 10ng/ml). La sobreexpresion de 5T4 en tumores a estado correlacionada con la progresión de enfermedad, y la evaluación de la expresión de 5T4 ha sido sugerida como una aproximación útil para identificar pacientes con prognosis de corto plazo (Mulder et al.(1997) *Clinc. Cancer Res.* 3:1923-30, Naganuma et al. (2002) *Anticancer Res.* 22:1033-8, Starzynska et al. (1994) *Br. J. Cancer* 69:899-

902, Starzynska et al. (1998) *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 10:479-84, Wrigley et al. (1995) *Int. J. Gynecol. Cancer* 5:269-274).

Varios anticuerpos anti-5T4 no humanos han sido descritos, incluyendo el mAb5T4, también denominado anticuerpo H8, que reconoce un epítopo conformación al del antígeno 5T4 (Shaw et al. (2002) *Biochem. J.* 363:137-45, PCT International Publication No. WO98/55607), a rat monoclonal antibody (Woods et al. (2002) *Biochem. J.* 366:353-65), and 5T4 mouse monoclonal antibody (U.S. Patent No. 5,869,053). Los anticuerpos anti-5T4 de cadena simple también han sido descritos, así como también las proteínas de fusión que incluyen secuencias de anticuerpo anti-5T4 fusionadas a una molécula terapéutica. Por ejemplo, las secuencias de anticuerpo anti-5T4 fusionadas la dominio constante IgG1 humano o al dominio extracelular de B7.1 de murino induces citólisis de las líneas de células tumorales que expresan 5T4 (Myers et al. (2002) *Cancer Gene Ther.* 9:884-96, Shaw et al. (2000) *Biochim. Biophys. Acta.* 1524:238-46; U.S. Patent Application Publication No. 2003/0018004). Similarmente, un anticuerpo anti-5T4 de cadena simple fusionado a un superantígeno puede estimular la citólisis dependiente de célula T de las células de carcinoma de pulmón de célula no pequeña *in Vitro* (Forsberg et al. (2001) *Br. J. Cancer* 85:129-36). Un ensayo clínico fase I que utiliza PNU-214936, un fragmento de murino Fab del anticuerpo monoclonal 5T4 fusionado a una enterocitotoxina A de estafilococo de superantígeno mutado (SEA), mostró citotoxicidad limitada y alguna respuesta anti-tumoral (Cheng et al. (2004) *J. Clinic. Oncol.* 22(4):602-609). Como una aproximación terapéutica alternativa, las vacunas 5T4 de

recombinantes se sugieren para el tratamiento de canceres (Mulryan et al. (2002) *Mol. Cancer Ther.* 1:1129-37; UK Patent Application Publications Nos. 2,370,571 y 2,378,704; EP Patent Application Publication Nos. EP 1,160,323 y 1,152,060).

A pesar del interés sustancial en el 5T4 como blanco potencial para inmunoterapia, las terapias que emplean el anticuerpo anti-5T4 conjugada a un agente terapéutico no se han descrito. La presente invención suministra anticuerpos anti-5T4 humanizados y conjugados de anticuerpo/droga así como también métodos para producir los anticuerpos descritos y los conjugados de anticuerpo/droga y los métodos para su uso o usos terapéuticos.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención suministra anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados y fragmentos de anticuerpo, y métodos para preparar y utilizar los mismos. Los anticuerpos anti-5T4 de la invención comprenden al menos una cadena ligera o al menos una cadena pesada, o fragmentos de estos, en donde el anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o el fragmento de anticuerpo (a) se une específicamente al antígeno 5T4 humanizado con una afinidad de unión de al menos aproximadamente 1 x 10-7 M a aproximadamente 1 x 10^{-12} M; (b) se une específicamente a un antígeno 5T4 humano con una afinidad de unión mayor de 1 x 10^{-11} M; (c) se une específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de unión mayor de 5 x 10^{-11} M; (d) se une específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de unión mayor que una afinidad de unión de anticuerpo anti-5T4 H8 de murino que se une al antígeno 5T4

humano; (e) apunta específicamente a las células que expresan 5T4 in vivo; (f) compite por la unión al antígeno 5T4 humano con un antígeno de cualquiera de (a)-(e); (g) específicamente se une a un epítopo unido mediante una cualquiera de (a)-(e); o (h) que comprende un dominio de unión de antígeno de una cualquiera de (a)-(e). Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados de la invención comprenden regiones constantes que son derivadas de las regiones constantes humanas, tales como las regiones constantes IgG1 o IgG4. Por ejemplo, la región constante de cadena pesada IgG1 humana puede comprender una secuencia de aminoácido de una cualquiera de las SEQ ID NO: 25 u 85-89. Como otro ejemplo, la región constante de cadena pesada IgG4 humana puede comprender prolina en la posición 241.

Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos representativos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden (a) una secuencia de región variable de cadena ligera que comprende los aminoácidos 1-107 de la SEQ ID NO:1, (b) la secuencia de región variable de cadena pesada comprende los aminoácidos 1-120 de la SEQ ID NO:2 o (c) una cadena ligera que comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:1, y la cadena pesada comprende una región variable que comprende una secuencia de residuos de aminoácido 1-120 de la SEQ ID NO: 2. Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos representativos adicionales incluyen anticuerpos que comprenden (a) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 1, y una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 2; o (b) una cadena ligera que comprende la

secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:3; y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:4.

Los anticuerpos anti-5T4 humanizados representativos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden (a) regiones de estructura que comprenden residuos de una región de estructura de anticuerpo humana; y (b) uno o más CDR de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 17 de una o más CDR de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 18. Por ejemplo, los residuos de una región de estructura de anticuerpo humano pueden comprender (a) una región de estructura de cadena ligera de anticuerpo humano del clon de la línea germinal de subgrupo IV DPK24, un subgrupo VκIII, o un clon de la línea germinal del subgrupo VκI; (b) una región de estructura de cadena pesada del anticuerpo humano seleccionado del grupo que consiste de DP-75, DP-8(VH1-2), DP-25, VI-2b y VI-3 (VH1-03), DP-15 y V1-8 (VH1-08), DP-14 y V1-18 (VH1-18), DP-5 y V1-24P (VH1-24), DP-4 (VH1-45), DP-7 (VH1-46), DP-10, DA-6 y YAC-7 (VH1-69),DP-88 (VH1-e), DP-3 y DA-8 (VH1-f); (c) una secuencia de consenso de la región de estructura de cadena pesada de (b) o (d) una región de estructura que es al menos 95% idéntica a la región de estructura de (a)-(c).

Los anticuerpos anti-5T4 humanizados representativos de la invención también pueden incluir dos o más CDR de la SEQ ID NO: 17 o 18, tal como dos o tres CDR de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 17 o todos los tres CDR de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 18, o uno o más CDR de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 17 y uno o

más CDR de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:18 o todos los CDR de la SEQ ID NO: 17 y 18.

Los anticuerpos anti-5T4 humanizados representativos de la invención también pueden comprender una región variable de cadena ligera que comprende (a) una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:17 o 23; (b) una secuencia de aminoácido que es la menos 78% idéntica a la SEQ ID NO:17; o (c) una secuencia de aminoácido que es la menos 81% idéntica a la SEQ ID NO: 23. de manera similar, los anticuerpos anti-5T4 humanizados de la invención pueden comprender una región variable de cadena ligera secuenciada codificada por un ácido nucleico que comprende: (a) una secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:22 u 81; (b) una secuencia de nucleótido que es al menos 90% idéntica con el ácido nucleico de la SEQ ID NO:22; (c) una secuencia de nucleótido que es al menos 91% idéntica al ácido nucleico de la SEQ ID NO:81; o (d) un ácido nucleico que se hibridaza específicamente al complemento de la SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 81 bajo condiciones de hibridización estrictas.

Los anticuerpos anti-5T4 humanizados representativos de la invención también pueden comprender una región variable de cadena pesada que comprende (a) una secuencia de aminoácido establecida como una cualquiera de la SEQ ID NO:18, 19, y 21; (b) una secuencia de aminoácido que es al menos 83% idéntica con la SEQ ID NO: 18; (c) una secuencia de aminoácido que es al menos 81% idéntica con la SEQ ID NO:19; o (d) una secuencia de aminoácido que es al menos 86% idéntica con la SEQ ID NO: 21. de manera similar, los anticuerpos humanizados de la invención pueden

comprender una secuencia de región variable de cadena pesada codificada por un ácido nucleico que comprende (a) una secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO: 20, 82, u 83; (b) una secuencia de nucleótido que es al menos 91% idéntica con el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 83; (c) una secuencia de nucleótido que es al menos 94% idéntica con el ácido nucleico de la SEQ ID NO:82; o (d) un ácido nucleico que se hibridaza específicamente al complemento de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 20, 82, y 83 bajo condiciones de hibridización estrictas.

Los anticuerpos anti-5T4 humanizados representativos adicionales de la invención incluyen anticuerpos que comprenden (a) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:5, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:6; (b) una secuencia de aminoácido de cadena ligera de la SEQ ID NO: 5, y una secuencia de aminoácido de cadena pesada de la SEQ ID NO: 6; (c) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO: 7, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:8; (d) una secuencia de aminoácido de cadena ligera de la SEQ ID NO: 7, y una secuencia de aminoácido de cadena pesada de la SEQ ID NO: 8; (e) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO: 9, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO: 10; (f) una secuencia de aminoácido de cadena ligera de la SEQ ID

NO: 9, y una secuencia de aminoácido de cadena pesada de la SEQ ID NO: 10; (g) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO: 11, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO: 12; (h) Una secuencia de aminoácido de cadena ligera de la SEQ ID NO: 11, y una secuencia de aminoácido de cadena pesada de la SEQ ID NO:12; (i) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO: 11, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:19; (j) una secuencia de aminoácido de cadena ligera de la SEQ ID NO: 11, y una secuencia de aminoácido de cadena pesada de la SEQ ID NO: 84; (k) una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO: 8; y (l) una secuencia de aminoácido de cadena ligera de la SEQ ID NO: 11, y una secuencia de aminoácido de cadena pesada de la SEQ ID NO: 8.

También se suministran conjugados de anticuerpos/droga para suministro de droga que comprende (a) un anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o un fragmento de anticuerpo de la invención; y (b) una droga, que esta directa o indirectamente unida al anticuerpo. Las drogas representativas incluyen agentes terapéuticos, tales como citotoxinas, radioisótopos, agentes inmunomoduladores, agentes anti-angiogénicos, agentes anti-proliferativos, agentes pro-apoptócicos, agentes quimioterapéuticos, y ácidos nucleicos terapéuticos. Una

citotoxina puede ser por ejemplo, un antibiótico, un inhibidor de polimerización de tubulina, un agente alquilatante, un inhibidor de síntesis de proteína, un inhibidor de proteína quinaza, un inhibidor de fosfataza, un inhibidor de topoisomeraza, o una enzima. Las citotoxinas antibioticas, tales como la caliqueamicina, N-acetil-γ-caliqueamicina, o derivados de estos tales como la N-acetil-γ-caliqueamicin dimetil hidracida, son particularmente útiles para terapias anti cáncer.

Los conjugados de anticuerpo/droga anti-5T4 descritos pueden incluir un ligador para unir el anticuerpo a la droga. Los ligadores representativos incluyen ácido 4-(4'acetilfenoxi) butanoico (AcBut), ácido 3-acetilfenil acídico (AcPac), y ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico (amida). Los conjugados de anticuerpo/droga también pueden incluir polietilen glicol u otros agentes para mejorar la incorporación de droga.

La presente invención suministra además un método para preparar conjugados de anticuerpo/droga que tienen la formula:

$$5T4Ab(-X-W)_m$$

En donde 5T4Ab es un anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o un fragmento de anticuerpo; X es un ligador que comprende un producto de cualquier grupo reactivo que puede reaccionar con el anticuerpo anti-5T4; W es una droga; m es una carga promedio para un producto de conjugación purificada; y $(-X-W)_m$ es un derivado de droga. De acuerdo con el método el derivado de droga se agrega al anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o un fragmento de

anticuerpo en donde la droga es 3-10% en peso del anticuerpo anti-5T4quimerico o humanizado o el fragmento de anticuerpo. El derivado de droga del anticuerpo anti-5T4 quimérico humanizado o el fragmento de anticuerpo son entonces incubados en una solución amortiguada compatible con proteína no nucleofílica que tiene un pH en el rango de aproximadamente 7 a 9 para producir un conjugado de anticuerpo/droga, en donde la solución comprende además (i) un cosolvente orgánico adecuado, y (ii) uno o más aditivos que comprenden al menos un ácido de bilis o sus sales, y en donde la incubación esta conducida a una temperatura que varia desde aproximadamente 30 °C a aproximadamente 35 °C durante un periodo de tiempo que varia desde aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 24 horas. El conjugado resultante es luego sometido a un proceso de separación cromatográfica para separar los conjugados de anticuerpo/droga con una carga en el rango de 3-10% en peso de droga con un fracción de conjugado baja (LCF) del anti-5T4 quimérico o humanizado no conjugado o el fragmento de anticuerpo, derivado de droga, y conjugados de agregados. Los conjugados de anticuerpo/droga producidos por el método también se suministran.

Para el suministro de una droga a las células que expresan 5T4, la presente invención suministra métodos por medio de los cuales las células son puestas en contacto con el conjugado de anticuerpo/droga que comprende (i) un anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado y (ii) una droga que esta unida al anticuerpo anti-5T4 quimérico humanizada directa o indirectamente. De acuerdo a los métodos descritos, la droga se internaliza con la célula blanco. Los métodos terapéuticos

00231

también son descritos aquí, los cuales comprenden administrar al sujeto que tiene un cáncer positivo para 5T4 una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de anticuerpo/droga anti-5T4 que comprende (i) un anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o un fragmento de anticuerpo, (ii) un agente terapéutico que se une al anticuerpo anti-5T4 humanizado por fragmento de anticuerpo directa o indirectamente. Las terapias anti-5T4 de la invención se pueden combinar con cualquier otra terapia conocida para efecto mejorado. Un segundo agente terapéutico se puede administrar en combinación con un conjugado de anticuerpo/droga anti-5T4 simultáneamente o consecutivamente en cualquier orden.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra los resultados del análisis Western blot para evaluar la expresión de 5T4 en líneas de célula tumorigénicas. Los Western blots fueron generados de lisados de células cultivadas así como también de tumores halo injertados en ratones desnudos. Las células CT26/neo, y el carcinoma de colon de ratón CT26 que expresan el gen de resistencia a la neomicina; CT26/5T4, células 5T4 que expresan la célula CT26.

La figura 2 muestra los resultados del análisis del Western blot de las muestras de CT26/5T4 y CT26/neo después de exposición de las líneas celulares a biotina. La muestra A es la fracción del 5T4 que ha sido biotinilada y capas de unirse a avidina. La muestra S es la cantidad residual del 5T4 presente en el sobrenadante después de la precipitación del extracto celular con

avidina. Esta representa una fracción que no ha sido biotinilada y esta por lo tanto localizada en el plasma de la célula. El 5T4 es detectado en ambas fracciones en membranas (a) e intracelular (S).

Las figuras 3A-3B muestran los resultados de los experimentos para cuantificar el antígeno 5T4 asociado a intracelular versus membrana. La figura 3ª muestra los Western blots preparados utilizando los extractos de célula CT26/5T4 diluidos como se indica. La muestra biotinilada representa la cantidad residual de 5T4 presente en la muestra luego del vaciamiento de la muestra biotinilada que utiliza avidina, es decir, la cantidad de 5T4 no asociado a membrana. La muestra total representa la suma de la cantidad total de la cantidad vaciada por medio de la avidina, es decir la cantidad de antígeno 5T4 no asociado a membrana y asociado a membrana. En la figura 3 demuestra las curvas de regresión lineal determinadas mediante la dilución de la muestra del y la densidad óptica de la banda H8-reactiva. La cantidad de antígeno 5T4 asociado a membrana se describe como la diferencia entre la densidad óptica de la muestra total y la densidad óptica de la muestra biotinilada después del vaciamiento de avidina. Como se describió en el ejemplo 1, la cantidad de 5T4 sobre la membrana celular (5T4M) se calculo por ser el 24% del 5T4 celular total en las células CT26/5T4.

La figura 4 muestra los resultados del Western blot que demuestran que el antígeno 5T4 sobre la superficie celular de la célula CT26 y la 5T4, las células DLD-1 (células de carcinoma de colon humano), las células N87 (células de carcinoma gástrico

humano), las células PC3-MM2 (células de carcinoma de postrata humana), y las células PC3 (células de carcinoma de próstata humana).

La figura 5A-5B muestran los resultados de los análisis FACS para detectar la localización de la membrana del antígeno 5T4. En las células MDAMB435/neo la señal del H8 coincide con aquella del control IgG (figura 5A). Como contraste, las células MDAMB435/5T4, la señal resultante del anticuerpo H8 es más de 100 veces mayor que aquella del anticuerpo de control, indicando la presencia de 5T4 sobre la membrana celular (figura 5B). La detección negro, detección del antígeno 5T4 gris, detección mediante un control IgG.

La figura 6 muestra los resultados del análisis FACS para detectar el antígeno 5T4 sobre la membrana del N87 (células de carcinoma gástrico humano), PC14PE6 (células de carcinoma de pulmón humano), y células NCI-H157 (células de carcinoma de pulmón humano). En cada caso, la señal resultante del anticuerpo H8 es aproximadamente 10 veces mayor que aquella del anticuerpo de control, indicando la presencia de 5T4 sobre la membrana celular. Gris, detección de antígeno 5T4; negro, detección de un control IgG.

La figura 7 es una grafica lineal que describe las mediciones del anticuerpo H8 fluorescentemente marcado detectado sobre la superficie celular de la célula CT26/5T4 en el medio de cultivo celular. La fluorescencia media del anticuerpo asociado membrana diminuyo como función del tiempo. El anticuerpo no fue liberado

en el medio. Estos resultados demuestran que el complejo anticuerpo H8/5T4 es internalizado por las células CT26/5T4.

La figura 8 es una grafica lineal que describe la citólisis selectiva de las células MDAMB435/5T4 expuestas a un conjugado anti-5T4 que comprende el anticuerpo H8 conjugado a caliqueamicina utilizando el ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico como un ligador.

Las figuras 9A-9B son líneas graficas que describen la citólisis de las células que expresan 5T4 expresadas a un conjugado anti-5T4 (H8PEG2K-AcBut-CalicDMH) que comprende anticuerpo H8 PEGilado conjugado a caliqueamicina utilizando ácido 4-(4'-acetilfenoxi) butanoico (AcBut) como un ligador. Ver ejemplo 2. La figura 9A que las células MDAMB435/neo a las que les falta el antígeno 5T4 son aproximadamente igualmente susceptibles a la citólisis mediante H8PEG2K-AcBut-CalichDMH como mediante caliqueamicina libre. Las figuras 9 muestran la citólisis mejorada de las células que expresan 5T4 expuestas a H8PEG2K-AcBut-CalichDMH comparadas con la caliqueamicina libre.

La figura 10 es una gráfica lineal que describe la inhibición del crecimiento de los tumores MDAMB435/5T4 expuestos a los conjugados de H8-caliqueamicina preparados utilizando los ligadores indicados. El PBS, la solución amortiguad de fosfato; H8-AcBut-CalichDMH, el anticuerpo H8 conjugado a caliqueamicina utilizando ácido 4-(4'-acetilfenoxi) butanoico (AcBut); H8-AcPac-CalichDMH, anticuerpo H8 conjugado a caliqueamicina utilizando ácido 3-acetilfenil acídico; H8-amida-calichDMH, anticuerpo H8

conjugado a caliqueamicina utilizando ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico; H8PEG(mal2)-AcBut-CalichDMH, anticuerpo PEGilado, conjugado a la caliqueamicina utilizando ácido 4-(4'-acetilfenoxi) butanoico (AcBut).

Las figuras 11A-11B son graficas lineales que describen la inhibición del crecimiento de los tumores MDAMB435/5T4 en la presencia de sustancias de control (figura 11A) o conjugados de caliqueamicina H8 (Figura 11B). el CMA, el anticuerpo anti-CD33 conjugado a la caliqueamicina (control negativo, es decir utilizado para evaluar la citotoxicidad debido a la toma de tumor de un conjugado por medio de las células a las que les falta el antígeno blanco); PBS, solución salina amortiguada de fosfato; H8+CalichDMH, una mezcla de anticuerpo H8 y caliqueamicina (no conjugadas); CalichDMH, caliqueamicina libre; H8-AcPac-CalichDMH, anticuerpo anti H8 conjugado a caliqueamicina utilizando ácido 3-acetilfenil acídico; H8-amida-CalichDMA, anticuerpo H8 conjugado a caliqueamicina utilizando ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico.

La figura 12 es una grafica lineal que describe la inhibición del crecimiento de los tumores NCI-H157 expuestos a los conjugados de caliqueamicina H8 indicados o a las sustancias de control. El anticuerpo H8-AcPac-CalichDMH, H8 conjugado a la caliqueamicina utilizando ácido 3-acetilfenil acídico; H8-amida-CalichDMA, el anticuerpo H8 conjugado a caliqueamicina que utiliza el ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico; CMA, el anticuerpo anti-CD33 conjugado a caliqueamicina (control negativo); PBS, solución salina amortiguada de fosfato; H8, y anticuerpo H8 no conjugado.

Las figuras 13A-13B son graficas lineales que describen la inhibición del crecimiento de los tumores N87 en la presencia de sustancias de control (figura 13A) o conjugados de H8-caliqueamicina (figura 13B). El CMA, el anticuerpo anti-CD33 conjugado a caliqueamicina (control positivo) PBS, solución salina amortiguad de fosfato; H8+CalichDMH, una mezcla de anticuerpo H8 y caliqueamicina (no conjugada); CalichDMH, caliqueamicina libre; H8-AcPac-CalichDMH, anticuerpo H8 conjugado a caliqueamicina que utiliza ácido 3-acetilfenil acídico; H8-amida-CalichDMA, anticuerpo H8 conjugado a caliqueamicina que utiliza ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico.

La figura 14 es un gráfica lineal que describe la inhibición de los tumores PC14PE6 expuestos a los conjugados H8/caliqueamicina o sustancias de control. El H8-AcPac-CalichDMH, el anticuerpo H8 conjugado a caliqueamicina que utiliza el ácido 3-acetilfenil acídico; H8-amida-CalichDMA, anticuerpo H8 conjugado a caliqueamicina que utiliza ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico; CMA el anticuerpo anti-CD33 conjugado a caliqueamicina (control negativo); PBS, solución salina amortiguad de fosfato; H8, anticuerpo H8 conjugado no conjugado.

Las figuras 15A-15G son imágenes de pulmones infestados de tumor de un modelo ortotópico de cáncer de pulmón. La figura 15A es una fotografía de un pulmón de ratón normal escindido; el corazón aparece oscuro. La figura 15B es una foto de un pulmón de ratón escindido infestado con nódulos tumorales luego de inyección intravenosa de las células tumorales PC14PE6 (ver ejemplo 4); H, Herat. La figura 15 es una imagen microscópica (amplificación 4X)

que muestra el tórax después de colapsar los pulmones. Los nódulos de pulmón (LN) son distinguibles del tejido de pulmonar normal (L). La cavidad toráxica se relleno con fluido hemorrágico (fusión pleural, PE). Las figuras 15D-15G son fotomicrografias de secciones teñidas con hematoxilina y eosina de un pulmón embebido en parafina y tejido cardiaco, que demuestra la extensión de la infiltración del tumor y la destrucción del tejido normal. Las figuras 15D-15E muestran infiltrados de células tumorales en la cavidad pleural (15D) y el pericardio (15E). Las figuras 15F-15G muestran la reducción del tejido pulmonar funcional mediante la proliferación del tejido tumoral en espacio perialveolar.

La figura 16 es una grafica lineal que muestra la fracción de supervivencia (%) de ratones que lleven tumores de pulmón ortotópicos que han recibido los tratamientos indicados. Todos los tratamientos fueron administrados intraperitonealmente 6 días después de la inyección de las células PC14B6. Ver ejemplo 4. H8 (línea negra sólida gruesa), anticuerpo H8 de murino no conjugado; PBS (línea blanca sólida), solución salina amortiguadora de fosfato; CMA 2 (línea blanca sólida negra), anticuerpo anti-CD33 conjugado a caliqueamicina administrada en una dosis de 2 µg de caliqueamicina; CMA 4 (línea con manchas pequeñas) anti-CD33

Los resultados del conjugado de H8 de caliqueamicina administrado en una dosis de 2µg o a una dosis de 4 µg no fueron distinguibles durante un período de 120 días. Diez animales fueron incluidos en cada grupo de tratamiento. Cada régimen de tratamiento consistió

de 3 dosis administradas intraperitonealmente con 4 días de intervalo entre cada dosis.

La Figura 17 es una gráfica de barras que muestra los volúmenes plurales en ratones que murieron de tumores pulmonares luego de los tratamientos de control indicados. PBS, solución salina de fosfato amortiguada; H8, anticuerpo H8 no conjugado; CMA 2, anticuerpo f anti-CD33 conjugado a caliqueamicina administrado a 2 µg por dosis; CMA 4, anticuerpo anti-CD33 conjugado a caliqueamicina administrado a 4 µg por dosis; n, número de animales. El volumen de efusión pleural no fue reducido luego de la administración del anticuerpo H8 no conjugado o del CMS conjugado de control.

La Figura 18 es un alineamiento de la región variable de cadena ligera H8 de murino (amino ácidos 21-127 de la SEQ ID NO: 16) y el clon de línea germinal DPK24 (SEQ ID NO:63). Las secuencias en las cajas, los CDR; los asteriscos, posiciones en las cuales los amino ácidos del H8 de murino son mantenidos en la versión 1 de la región variable de cadena ligera H8 humanizada, y en la cual los amino ácidos del DPK24 humano son mantenidos en la versión 2 de la región variable de cadena ligera humanizada; residuos subrayados, mutaciones que incrementan la expresión de anticuerpo.

La Figura 19 es un alineamiento de las secuencias de la región variable de cadena ligera humana del subgrupo VκIII (SEQ ID NO:65-70) y la región variable de cadena ligera H8 de murino (amino ácidos 21-127 de la SEQ ID NO:16). Los residuos que

difieren de las secuencias de estructura humana cuando se comparan con las secuencias de estructura H8 están subrayados. Para la humanización del H8, uno o más residuos de las posiciones correspondientes en H8 se sustituyen con un residuo de una secuencia de estructura humana. Las secuencias en los cuadros, los CDR.

La Figura 20 es un alineamiento de las secuencias de región variable de cadena ligera humana del subgrupo VκI (SEQ ID NO: 71-80) y la región variable de cadena ligera H8 de murino (amino ácidos 21-127 de la SEQ ID NO:16). Para la humanización del H8, uno o más residuos en las posiciones correspondientes en el H8 se sustituyeron con un residuo de una secuencia de estructura humana. Las secuencias en cuadros, los CDR.

La Figura 21 es un alineamiento de la región variable de cadena pesada H8 de murino (amino ácidos 20-139 de la SEQ ID NO:14) y el clon de la línea germinal DP75 (SEQ ID NO:64). Las secuencias en cajas, los CDR; asteriscos, posiciones en las cuales los amino ácidos del murino H8 se mantienen en la versión 1 de la región variable de cadena pesada H8 humanizada (es decir, K38, S40, e I48), y en la cual los amino ácidos del DP75 humano son mantenidos en la región variable de cadena pesada humanizada versión 2.

La Figura 22 es un alineamiento de las secuencias de la región variable de cadena pesada humana del subgrupo I (SEQ ID NO:52-60) y las secuencias de estructura de consenso derivadas del (SEQ ID NO:49-51).

La Figura 23 es un alineamiento de la región variable de cadena pesada H8 de murino (amino ácidos 20-139 de la SEQ ID NO:14) y la región variable de cadena pesada H8 humanizada derivada de la secuencia de consenso del subgrupo I de la región variable de cadena pesada, es decir, la región variable de cadena pesada humanizada versión 3 (SEQ ID NO:19). Secuencias en cuadros, los CDR.

Las Figuras 24A-24C muestran las secuencias de la región variable de cadena ligera representativas (Figura 24A) y las secuencias de la región variable de cadena pesada (Figuras 24B-24C) de los anticuerpos anti-5T4 humanizados.

Las Figuras 25A-25O muestran los resultados del análisis BLAST desarrollado utilizando las regiones variables humanizadas como secuencias de consultas. Ver también Tablas 6 y 7.

Las Figuras 26A-26B muestran las secuencias de las regiones constantes humanas representativas utilizadas para preparar los anticuerpos anti-5T4 humanizados.

Las Figuras 27A-27G muestran las secuencias del amino ácido de cadena ligera y cadena pesada de los anticuerpos anti-5T4 representativos. La Figura 27A muestra un anticuerpo anti-5T4 quimérico que tiene (a) una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera H8 de murino y una región constante kappa humana (SEQ ID NO: 1), y (b) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada H8 de murino y

una región constante IgG1 humana (SEQ ID NO:2). La Figura 27B muestra un anticuerpo anti-5T4 quimérico que tiene (a) una cadena ligera que comprende la región variable de cadena ligera H8 de murino y una región constante kappa humana (SEQ ID NO:3), y (b) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada H8 de murino y una región constante IgG4 humana mutada (SEQ ID NO:4). La Figura 27C muestra un anticuerpo anti-5T4 semihumano que tiene (a) una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera H8 humanizada versión 1 y una región constante kappa humana (SEQ ID NO:5), y (b) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada H8 de murino y una región constante IgG4 humana mutada (SEQ ID NO:6). La Figura 27D muestra un anticuerpo anti-5T4 humanizado que tiene (a) una cadena ligera que comprende la región variable de cadena ligera H8 humanizada versión 1 y una región constante kappa humana (SEQ ID NO:7), y (b) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada H8 humanizada versión 1 y una región constante IgG4 humana mutada (SEQ ID NO:8). La Figura 27E muestra un anticuerpo anti-5T4 humanizado que tiene (a) una cadena ligera que comprende la región variable de cadena ligera H8 humanizada versión 1 y una región constante kappa humana (SEQ ID NO:9), y (b) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada H8 humanizada versión 2 y una región constante IgG1 humana (SEQ ID NO:10). La Figura 27F muestra el anticuerpo anti-5T4 humanizado que tiene (a) una cadena ligera que comprende la región variable de cadena ligera H8 humanizada versión 2 y una región constante kappa humana (SEQ ID NO: 11), y (b) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada H8 humanizada versión 2 y una región constante IgG4 humana

mutada (SEQ ID NO:12). La Figura 27G muestra un anticuerpo anti-5T4 humanizado que tiene (a) una cadena ligera que comprende la región variable de cadena ligera H8 humanizada versión 2 y una región constante kappa humana (SEQ ID NO:11), y (b) una cadena pesada que comprende la región variable de cadena pesada H8 humanizada versión 3 y una región constante IgG4 humana mutada (SEQ ID NO:84). En subrayado simple, las regiones variables; las secuencias en cuadros, los CDR; asteriscos, mutación prolinea.

Las Figuras 28A-28B muestran los resultados de los análisis FACS para detectar el antígeno 5T4 sobre las células MDAMB435/neo (Figura 28A) o sobre las células MDAMB435/5T4 (Figura 28B) utilizando H8 de murino, versiones quimérica de H8, y versiones humanizadas de H en las concentraciones indicadas. Todos los anticuerpos muestran unión selectiva a las células MDAMB435/5T4.

La Figura 29 es una gráfica lineal que muestra las propiedades de unión del anticuerpo H8 quimérico y las versiones de H8 humanizado 1-3, que se determinaron utilizando un ensayo de unión competitiva. El IC50 del anticuerpo H8 quimérico y las versiones H8 humanizadas 1-3 fueron 1.0×10^{-9} M, 1.0×10^{-9} M, 1.4×10^{-9} M, y 1.5×10^{-9} M, respectivamente. Ver Ejemplo 5.

La Figura 30 es una gráfica lineal que muestra detección del anticuerpo H8 quimérico y el anticuerpo H8 humanizado sobre la superficie celular de las células MDAMB435/5T4 durante un período de 25 horas. El nivel reducido de detección sobre el período de observación demuestra la internalización de ambos anticuerpos.

Ningún anticuerpo detectable estuvo presente en el medio acondicionado durante el curso del experimento.

La Figura 31 es una gráfica de barras que describe los niveles de expresión transitoria de anticuerpo H8 quimérico y las versiones H8 humanizadas 1-3 en células COS-1. Los tres anticuerpos H8 humanizados se expresaron en un nivel similar (versión 1, 4.4 mg/L/48 horas; versión 2, 2.7 mg/L/48 horas; versión 3, 3.9 mg/L/48 horas) que fue mayor que el observado para el anticuerpo H8 quimérico (0.6 mg/L/48 horas). Ver Ejemplo 6.

Las Figuras 32A-32B son gráficas de líneas que muestran la inhibición del crecimiento del esferoide de las células MDAMB435/neo y MDAMB435/5T4 *in vitro* luego de 144 horas de exposición al H8-AcBut-CalichDMH, (anticuerpo H8 humanizado conjugado a caliqueamicina utilizando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanóico (AcBut) en las concentraciones indicadas.

Las Figuras 33A-33C son gráficas de líneas que describen la inhibición del crecimiento de los tumores N87 en la presencia de las sustancias de control (Figura 33A) o los conjugados de caliqueamicina H8 humanizados (Figura 33B) y los cálculos de respuesta (Figura 33C). el PBS, la solución salina amortiguada de fosfato; el huH8+CalichDMH, una mezcla del anticuerpo H8 y la caliqueamicina (no conjugada); CMA, anticuerpo anti-CD33 conjugado a caliqueamicina; CMC, el anticuerpo anti-CD22 conjugado a la caliqueamicina; huH8-AcBut-CalichDMH, el anticuerpo H8 humanizado conjugado a la caliqueamicina utilizando el ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanóico (AcBut); (4), el conjugado

de anticuerpo-caliqueamicina administrado a una dosis de 4 µg de caliqueamicina; (2), conjugado de anticuerpo-caliqueamicina administrado a una dosis de 2 µg de caliqueamicina; (1), conjugado de anticuerpo-caliqueamicina administrado a una dosis de 1 µg de caliqueamicina; las flechas, la programación de dosificación en los días 1, 5, y 9; CR, respuesta completa; PR, respuesta parcial; TR, sin respuesta; NR, sin respuesta. Ver Ejemplo 9.

Las Figuras 34A-34C son gráficas lineales que describen la inhibición del crecimiento de los tumores MDAMB435/5T4 en la presencia de sustancias de control (Figura 34A) o conjugados H8-caliqueamicina humanizados (Figura 34B) y los cálculos de respuesta (Figura 34C). PBS, solución salina amortiguada de fosfato; huH8+CalichDMH, una mezcla del anticuerpo H8 y la caliqueamicina (no conjugada); CMA, anticuerpo anti-CD33 conjugado a caliqueamicina; CMC, anticuerpo anti-CD22 conjugado a caliqueamicina; huH8-AcBut-CalichDMH, el anticuerpo H8 humanizado conjugado a caliqueamicina utilizando el ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanóico (AcBut); (4), conjugado de anticuerpo-caliqueamicina administrado a una dosis de 4 µg de caliqueamicina; (2), conjugado de anticuerpo-caliqueamicina administrado a una dosis de 2 µg de caliqueamicina; (1), conjugado de anticuerpo-caliqueamicina administrado a una dosis de 1 µg de caliqueamicina; flechas, programación de dosificación en los días 1, 5, y 9; CR, respuesta completa; PR, respuesta parcial; TR, sin respuesta; NR, sin respuesta. Ver Ejemplo 9.

Las Figuras 35A-35E son gráficas lineales que describen la inhibición del crecimiento de los tumores PC14PE6 en la presencia de sustancias de control (Figura 35A) o los conjugados H8-caliqueamicina humanizados (Figura 35B, 35D, 35E) y las respuestas calculadas (Figura 35C). Las Figuras 35A-35C presentan datos que pertenecen a los nuevos tumores crecidos, y la Figura 35D presenta los datos que pertenecen al tratamiento de los tumores relapsados. PBS, solución salina amortiguada de fosfato; huH8+CalichDMH, una mezcla del anticuerpo H8 y caliqueamicina (no conjugada); CMA, anticuerpo anti-CD33 conjugado a caliqueamicina; huH8-AcBut-CalichDMH, anticuerpo H8 humanizado conjugado a caliqueamicina utilizando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanóico (AcBut); (4), conjugado de anticuerpo-caliqueamicina administrado en una dosis de 4 µg de caliqueamicina; (2), conjugado de anticuerpo-caliqueamicina administrado a una dosis de 2 µg de caliqueamicina; (1), conjugado de anticuerpo-caliqueamicina administrado a una dosis de 1 µg de caliqueamicina; (4*), conjugado de anticuerpo-caliqueamicina administrado a una dosis de 4 µg de caliqueamicina después de que a los tumores se les permitió crecer a aproximadamente 1.08 cm^3 antes del tratamiento con el conjugado; flechas, programación de dosificación en los días 1, 5, y 9 (Figuras 35A, 35B, y 35D) o los días 19, 23, y 27 (Figura 35C); CR, respuesta completa; PR, respuesta parcial; TR, sin respuesta; NR, sin respuesta. Ver Ejemplo 9.

Las Figuras 36A-36B muestran fotografías de ratones que poseen los tumores PC14PE6 21 días luego del tratamiento con el vehículo (solución salina amortiguada de fosfato) (Figura 367A) o con huH8-AcBut-CalichDMH (anticuerpo H8 humanizado conjugado a

caliqueamicina utilizando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanóico (AcBut)) (Figura 36B). Los tumores PC14PE6 fueron de aproximadamente 80 mm^3 en el momento en que fueron administrados el vehículo o el conjugado de H8-caliqueamicina humanizada. Los agentes fueron administrados mediante inyección intraperitoneal en un total de tres dosis de 4 µg de caliqueamicina por dosis, cada dosis separada por tres días. La flecha en la Figura 36A identifica un tumor visible. El área circunscrita por la línea punteada en la Figura 36B identifica el área donde el tumor PC14PE6 ha regresado. Ver Ejemplo 9.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

1. Anticuerpos Quiméricos y Humanizados Anti-5T4

El H8 es un anticuerpo IgG1 de ratón monoclonal generado por hibridoma que se describe en la Publicación Internacional PCT No. WO 98/55607 y en Forsberg et al. (1997) J. Biol. Chem. 272(19):124430-12436. Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos de la invención incluyen secuencias de región variable del anticuerpo anti-5T4 de murino y residuos adicionales derivados de las secuencias de anticuerpo humanas. Los anticuerpos anti-5T4 humanizados de la invención incluyen los residuos de unión de antígeno provenientes del anticuerpo anti-5T4 de ratón H8 y los residuos adicionales derivados de las secuencias de anticuerpo humano. Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados descritos son también denominados anticuerpos H8 quiméricos y anticuerpos H8 humanizados. Los anticuerpos H8 quiméricos y humanizados representativos se establecen en las Figuras 27A-27F.

El término anticuerpo se refiere a una proteína de inmunoglobulina, o a fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión de antígeno (por ejemplo, Fab, Fab modificado, Fab', $F(ab')_2$ o fragmentos Fv, o una proteína que tiene al menos una región variable de cadena ligera de inmunoglobulina o al menos una región de cadena pesada de inmunoglobulina). Los anticuerpos humanizados de la invención incluyen diacuerpos, anticuerpos tetraméricos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos tetravalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos de dominio específico que reconocen un epítopo particular (por ejemplo, anticuerpos que reconocen un epítopo unido por el anticuerpo H8).

El término anticuerpo anti-5T4 se refiere a un anticuerpo que se une específicamente al antígeno 5T4, particularmente el antígeno 5T4 humano. El antígeno 5T4 es una fosfoproteína no glicosilada 72 kDa encontrada en la superficie de las células de trofoblasto y numerosos tipos de célula de cáncer Ver Hole et al. (1988) Br. J. Cancer 57:239-46, Hole et al. (1990) Int. J. Cancer 45:179-184; Publicación Internacional PCT No. WO89/07947; Patente U.S. No. 5,869,053.

El término unión se refiere a la afinidad entre dos moléculas, por ejemplo, un antígeno y un anticuerpo. Como se utiliza aquí, la unión específica significa una unión preferencial de un anticuerpo a un antígeno en una muestra heteróloga que comprende múltiples diferentes antígenos. La unión de un anticuerpo a un antígeno es específica si la afinidad de unión es de al menos

aproximadamente 10^{-7} M o mayor, tal como al menos aproximadamente 10^{-8} M o mayor, incluyendo al menos aproximadamente 10^{-9} M o mayor, al menos aproximadamente 10^{-11} M o mayor, o al menos aproximadamente 10^{-12} M o mayor. Por ejemplo, la unión específica de un anticuerpo de la invención a un antígeno 5T4 humano incluye la unión en el rango de al menos aproximadamente 1 x 10^{-7} a aproximadamente 1 x 10^{-12}. La unión específica de un anticuerpo de la invención al antígeno 5T4 humano también incluye la unión en el rango de al menos 3 x 10^{-10} M a aproximadamente 12 x 10^{-10} M, tal como dentro del rango de aproximadamente 4 x 10^{-10} M a aproximadamente 9 x 10^{-10} M, o tal como dentro del rango de aproximadamente 7 x 10^{-10} M a aproximadamente 12 x 10^{-10} M, o tal como dentro del rango de aproximadamente 7 x 10^{-10} M a aproximadamente 9 x 10^{-10} M, o tal como dentro del rango de aproximadamente 9 x 10^{-10} M a aproximadamente 12 x 10^{-10} M, o tal como dentro del rango de aproximadamente 11 x 10^{-10} M a aproximadamente 12 x 10^{-10} M, o afinidades de unión mayores tales como aproximadamente 1.0 x 10^{-11} M, o aproximadamente 10 x 10^{-11} M o aproximadamente 1.0 x 10^{-11} M a aproximadamente 5 x 10^{-11} M, o aproximadamente 5.0 x 10^{-11} M a aproximadamente 10 x 10^{-11} M. La frase se une específicamente también se refiere a seleccionar el blanco para las células que expresan 5T4 cuando se administran a un sujeto.

El término anticuerpo quimérico se utiliza aquí para describir un anticuerpo que comprende las secuencias desde al menos dos especies diferentes. Los anticuerpos humanizados son un tipo de anticuerpo quimérico. Un anticuerpo anti-5T4 quimérico puede comprender (a) una región variable de cadena ligera que tiene una

secuencia de amino ácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:1 y una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de amino ácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:2; (b) una secuencia de amino ácido de cadena ligera de la SEQ ID NO:1 y una secuencia de amino ácido de cadena pesada de la SEQ ID NO:2; o (c) una secuencia de amino ácido de cadena ligera de la SEQ ID NO:3 y una secuencia de amino ácido de cadena pesada de las SEQ ID NO:4.

El término humanizado se utiliza aquí para describir un anticuerpo, en donde los residuos de la región variable responsables pro la unión de antígeno (es decir, los residuos de una región determinante de complementariedad y cualquiera otros residuos que participan en la unión del antígeno) se derivan de especies no humanas, aunque permanecen residuos de región variable (es decir, residuos de las regiones de estructura) y las regiones constantes se derivan, al menos en parte, de las secuencias de anticuerpo humanas. Los residuos de las regiones variables y regiones constantes de un anticuerpo humanizado también se pueden derivar de fuentes no humanas. Las regiones variables de un anticuerpo humanizado también se describen como humanizadas (es decir, región variable de cadena ligera o pesada humanizada). Las especies no humanas son típicamente aquellas que se utilizan para inmunización con un antígeno, tal como las especies de ratón, rata, conejo, primate no humano, u otros mamíferos no humanos.

Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados representativos de la invención comprenden al menos una cadena ligera o al menos

una cadena pesada, o fragmentos de ésta, en donde el anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o el fragmento de anticuerpo (a) se une específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de unión de al menos aproximadamente 1 x 10^{-7} M a aproximadamente 1 x 10^{-12} M; (b) se une específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de unión mayor de 1 x 10^{-11} M; (c) se une específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de unión mayor de 5 x 10^{-11} M; (d) se une específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de unión mayor que la afinidad de unión del anticuerpo anti-5T4 H8 de murino unido al antígeno 5T4 humano; (e) apunta específicamente a las células que expresan 5T4 in vivo; (f) compiten por la unión al antígeno 5T4 humano con un anticuerpo de uno cualquiera de (a)-(e); (g) se une específicamente a una unión de epítopo mediante una cualquiera de (a)-(e); o (h) comprende un dominio de unión de antígeno de una cualquiera de (a)-(e).

El anticuerpo anti-5T4 H8 de murino se ha mostrado que reconoce un epítopo conformacional próximo al dominio de transmembrana del 5T4. La glicosilación, que es importante para la estructura y la inmunogenicidad, y las uniones disulfuro intramoleculares se requieren para unir el anticuerpo. También se ha mostrado que el anticuerpo anti-5T4 H8 no se une al 5T4 de ratón, aunque existe una identidad del 84% entre el 5T4 de ratón y de humano y 6 de 7 sitios de glicosilación N-ligado están conservados entre los dos. Las cisteínas N-terminal y C-terminal también están completamente conservadas entre el 5T4 humano y de ratón. El anticuerpo H8 de murino también se ha mostrado que se unen al 5T4 de humano cuando el sitio de glicosilación N-ligado en el amino ácido 192 se

remueve (Shaw et al. (2002) Biochem J. 365: 137-145). Existe alguna evidencia que sugiere que el anticuerpo anti-5T4 H8 no se une a la quimera 5T4 humana/ratón que tiene LRR2 de ratón (los residuos 173-361 que reemplazan los residuos humanos 173-355) y aún el anticuerpo se une a la quimera recíproca. Existe también evidencia que sugiere que tanto el anticuerpo H8 quimérico como el anticuerpo H8 humanizado se une a la quimera 5T4 que contiene los residuos de ratón 282-361. Esta evidencia conduce a la conclusión de que el epítopo H8 esta localizado entre los amino ácidos 173 y 252. La evidencia adicional sugiere que el H8 quimérico puede no unirse a una quimera anti-5T4 de humano/ratón que contiene los residuos de ratón 173-258, mientras que el anticuerpo H8 humanizado se ha unido ligeramente a concentraciones mayores.

Los anticuerpos de ocurrencia natural son glicoproteinas tetraméricas (H_2L_2) de aproximadamente 150,000 daltons, compuestos de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Las dos cadenas pesadas están ligadas una a la otra mediante enlaces disulfuro y cada cadena pesada esta ligada a una cadena ligera mediante un enlace disulfuro. Cada una de las cadenas ligera y pesada se caracteriza adicionalmente por una región variable amino terminal y una región constante. El término variable se refiere al hecho de que ciertas posiciones de los dominios variables difieren extensivamente en secuencia entre los anticuerpos y determinan sustancialmente la afinidad de unión y la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Las regiones variables de cada cadena ligera y pesada se alinean para formar un dominio de unión de antígeno. Las

regiones variables H8 humanizadas representativas se establecen en las Figuras 24A-22C (Las SEQ ID NO: 17, 18, 19, 21, y 23).

Los anticuerpos que tienen una estructura tetramérica, similar a los anticuerpos de ocurrencia natural, se pueden preparar recombinantemente utilizando técnicas estándar. Los anticuerpos producidos recombinantemente también incluyen anticuerpos de cadenas simple, en donde las regiones variables de un par de cadena ligera y cadena pesada simple incluyen una región de unión de antígeno, y las proteínas de fusión, en donde una región variable de un anticuerpo anti-5T4 humanizado se fusiona a una secuencia efectuadora, tal como un dominio Fc, una citoquina, un inmunoestimulante, una citotoxina, o cualquier otra proteína terapéutica. Ver por ejemplo, Harlow & Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New Cork y Patentes U.S. No. 4,196,265; 4,946,778; 5,091,513; 5,132,405; 5,260,203; 5,677,427; 5,892,019; 5,985,279; 6,054,561.

Los anticuerpos tetravalentes (H_4L_4) que comprenden dos anticuerpos tetraméricos intactos, incluyen homodímeros y heterodímeros, se pueden preparar por ejemplo como se describió en la Publicación Internacional PCT No. WO 02/096948. Los dímeros del anticuerpo también se pueden preparar por vía de la introducción de el o los residuos de cisteína en la región constante del anticuerpo, que promueve la formación de la unión disulfuro intercadena, que utiliza los reticuladores heterobifuncionales (Wolff et al. (1993) Cancer Res. 53:2560-5), o mediante la producción recombinante para incluir una región

constante doble (Stevenson et al. (1989) Anticancer Drug Des. 3:219-30).

El término región determinante de complementariedad o CDR se refiere a residuos de las regiones variables del anticuerpo que participan en la unión de antígeno. Un número de definiciones de los CDR son de uso común. La definición Kabat esta basada en la variabilidad de secuencia, y en la definición Chothia esta basada en la localización de las regiones de aro estructural. La definición de AbM es un compromiso entre las aproximación es kabat y Chothia. Los CDR de la región variable de cadena ligera están unidos mediante los residuos en las posiciones 24 y 34 (CDR1-L), 50 y 56 (CDR2-L), y 89 y 97 (CDR3-L) de acuerdo a Kabat, Chothia, o el algoritmo AbM. De acuerdo a la definición Kabat, los CDR de la región variable de cadena pesada están unidos mediante los residuos en las posiciones 31 y 35B (CDR1-H), 50 y 65 (CDR2-H), y 95 y 102 (CDR3-H)(numeración de acuerdo a Kabat). De acuerdo a la definición de Chothia, los CDR de la región variable de cadena pesada están unidos mediante los residuos en las posiciones 26 y 32 (CDR1-H), 52 y 56 (CDR2-H), y 95 y 102 (CDR3-H)(numeración de acuerdo a Chothia). De acuerdo a la definición AbM, los CDR de la región variable de cadena pesada están unidos mediante los residuos en las posiciones 26 y 35B (CDR1-H), 50 y 58 (CDR2-H), y 95 y 102 (CDR3-H)(numeración de acuerdo a Kabat). Ver Martin et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272; Martin et al. (1991) Methods Enzymol. 203: 121-153; Pedersen et al. (1992) Immunomethods 1: 126; y Rees et al. (1996) In Sternberg M.J.E. (ed.), Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, pp. 141-172.

El término región determinante de especificidad o SDR se refiere a aquellos residuos dentro de los CDR que interactúa directamente con el antígeno, que corresponde a los residuos hipervariables. Ver (Padlan et al. (1995) FASEB J. 9: 133-9).

Los residuos de estructura son aquellos residuos de la región variable diferentes de los residuos hipervariables. Las estructuras humanas representativas de la región variable de cadena pesada que se pueden utilizar para preparar los anticuerpos anti-5T4 humanizados incluyen las regiones de estructura de DP-75 y DP-8(VH1-2), DP-25, VI-2b y VI-3(VH1-03), DP-15 y V1-8 (VH1-08), DP-14 y V1-18(VH1-18), DP-5 y V1-24P(VH1-24), DP-4(VH1-45), DP-7(VH1-46), DP-10, DA-6 y YAC-7(VH1-69), DP-88(VH1-e), DP-3, y DA-8(VH1-f). Las secuencias de estructura de consenso basadas en las secuencias individuales anteriores también se pueden utilizar. Ver las Figuras 21-23. Las estructuras humanas representativas de la región variable de cadena ligera incluyen aquella del clon de la línea germinal humana DPK24 y los subgrupos del clon de la línea germinal VκIII y VκI, cada uno de los cuales muestra mayor del 60% de identidad de amino ácido cuando se compara con la región variable de cadena ligera H8. Ver Figuras 18-20.

Las regiones constantes de los anticuerpos anti-5T4 humanizados descritos se derivan de las regiones constantes de una cualquiera de IgA, IgD, IgE, IgG, IgM y cualquiera isotipos de estos (por ejemplo, los isotipos IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4 del IgG). La elección del isotipo humano (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) y la

modificación de los amino ácidos particulares en el isotipo humano pueden mejorar o eliminar la activación de los mecanismos de defensa del huésped y alterar la biodistribución de un anticuerpo humanizado de la invención. Ver (Reff et al. (2002) Cancer Control 9: 152-66).

Los anticuerpos humanizados se pueden preparar utilizando una cualquiera de una variedad de métodos que incluye revestimientos, injertos de regiones determinantes de complementariedad (los CDR), injertos de los CDR abreviados, injertos de regiones determinantes de especificidad (los SDR), y ensamblaje Frankenstein, como se describe adelante. Estas aproximaciones generales se pueden combinar con mutagénesis estándar y técnicas de síntesis para producir un anticuerpo anti-5T4 de cualquier secuencia deseada.

El revestimiento esta basado en el concepto de reducir las secuencias de amino ácido potencialmente inmunogénicas en un roedor u otro anticuerpo no humano al hacer resurgir en la superficie el exterior accesible del solvente del anticuerpo con las secuencias de amino ácido humanas. Así, los anticuerpos revestidos parecen menos extraños a las células humanas. Ver Padlan (1991) Mol. Immunol. 28:489-98. Un anticuerpo no humano es revestido al (1) identificar los residuos de la región de estructura exteriores expuestos en el anticuerpo no humano, que son diferentes de aquellos en las mismas posiciones en las regiones de estructura de un anticuerpo humano, y (2) reemplazar los residuos identificados con los amino ácidos que ocupan típicamente estas mismas posiciones en los anticuerpos humanos.

El injerto de los CDR se desarrolla al reemplazar uno o más de los CDR de un anticuerpo aceptador (por ejemplo, un anticuerpo humano) con los CDR de un anticuerpo donador (por ejemplo, un anticuerpo no humano). Los anticuerpos aceptadores se pueden seleccionar con base en la similitud de los residuos de estructura entre un anticuerpo aceptador candidato y un anticuerpo donador y se pueden además modificar para introducir residuos similares. Por ejemplo, una estructura aceptadora humana puede comprender una región variable de cadena pesada de una secuencia de consenso subgrupo I humano, opcionalmente con residuos donadores no humanos en una o más posiciones 1, 28, 48, 67, 69, 71, y 93. Como otro ejemplo, una estructura aceptadora humana puede comprender una región variable de cadena ligera de una secuencia de consenso del subgrupo I humano, opcionalmente con residuos donadores no humanos en una o más de las posiciones 2, 3, 4, 37, 38, 45 y 60. Luego el injerto CDR, se pueden hacer cambios adicionales en las secuencias donadora y/o aceptadora para optimizar la unión de anticuerpo y la funcionalidad. Ver por ejemplo, Publicación Internacional PCT No. WO 91/09967.

El injertamiento de los CDR abreviados es una aproximación relacionada. Los CDR abreviados incluyen los residuos determinantes de especificidad y los amino ácidos adyacentes, que incluyen aquellos en las posiciones 27d-34, 50-55 y 89-96 en la cadena ligera, y en las posiciones 31-35b, 50-58, y 95-101 en la cadena pesada (convención de numeración de (Kabat et al. (1987)). Ver (Padlan et al. (1995) FASEB J. 9: 133-9). El injerto de los residuos determinantes de especificidad (SDR) es puesto como

premisa sobre el entendimiento de que la especificidad de unión y afinidad de un sitio que combina anticuerpo se determina por los residuos más altamente variables dentro de cada una de las regiones determinantes de complementariedad (CDR). El análisis de estructuras tridimensionales de los complejos anticuerpo-antígeno, combinados con el análisis de los datos de la secuencia de amino ácido disponibles se utilizó para modelar la viabilidad de secuencia con base en la disimilaridad estructural de los residuos de amino ácido que ocurre en cada posición con el CDR. Ver Padlan et al. (1995) FASEB J. 9: 133-139. Las secuencias de polipéptido mínimamente inmunogénicas consisten de residuos de contacto, que son denominados como residuos determinantes de especificiadad (SDR), son identificados e injertados sobre las regiones de estructura humana.

De acuerdo a la aproximación Frankenstein, las regiones de estructura humana se identifican como teniendo homología de secuencia sustancial a cada región de estructura del anticuerpo no humano relevante, y los CDR del anticuerpo no humano se injertan sobre el compuesto de las diferentes regiones de estructura humana. Un método relacionado también útil para la preparación de los anticuerpos de la invención se describe en la Publicación de la Solicitud de Patente U.S. No. 2003/0040606.

Los anticuerpos anti-5T4 humanizados descritos aquí comprenden típicamente al menos una región variable de cadena ligera humanizada o una región variable de cadena pesada. Así, el anticuerpo anti-5T4 humanizado de la invención puede comprender una región variable de cadena ligera preparado al revestir,

injertar los CDR o SDR abreviados, o el montaje Frankenstein, como anteriormente, y una región variable de cadena pesada del anticuerpo no humano (por ejemplo, el anticuerpo H8 u otro anticuerpo anti-5T4 no humano). Alternativamente, una región variable de cadena ligera del anticuerpo no humano se puede combinar con una región variable de cadena pesada humanizada.

Los anticuerpos anti-5T4 humanizados representativos de la invención incluyen (a) anticuerpos que tienen uno o más de los CDR de un anticuerpo anti-5T4 no humanos seleccionados de los CDR de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO:17 o de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:18, tales como dos o más CDR seleccionados de los CDR de la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO:17 o de la región variable de cadena pesada de las SEQ ID NO:18; (b) los anticuerpos que tienen una cadena ligera comprenden una región variable que tiene dos o tres CDR de la SEQ ID NO:17; y (c) los anticuerpos que tienen una cadena pesada comprenden una región variable que tiene dos o tres CDR de la SEQ ID NO:18. Los anticuerpos anti-5T4 humanizados representativos de la invención también incluyen aquellos anticuerpos que tienen (a) una secuencia de amino ácido de la región variable de cadena ligera establecida como la SEQ ID NO:17 o 23; (b) una secuencia de amino ácido de la región variable de cadena ligera que es al menos 78% idéntica con la SEQ ID NO:17; o (c)una secuencia de amino ácido de la región variable de cadena ligera que es al menos 81% idéntica con la SEQ ID NO:23. Una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-5T4 humanizado funcional (es decir, un anticuerpo anti-5T4 que se une específicamente al antígeno 5T4) se puede codificar mediante (a)

un ácido nucleico de la SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:81; (b) un ácido nucleico que es al menos 90% idéntico con el ácido nucleico de la SEQ ID NO:22; (c) un ácido nucleico que es al menos 91% idéntico al ácido nucleico de la SEQ ID NO:81; o (d) un ácido nucleico que se hibridiza específicamente al complemento de la SEQ ID NO:22 o la SEQ ID NO:81 bajo condiciones de hibridización exigentes, por ejemplo condiciones de lavado finales de 0.1 x SSC a 65°C.

Los anticuerpos anti-5T4 humanizados representativos de la invención incluyen además aquellos anticuerpos que tienen (a) una secuencia de amino ácido de región variable de cadena pesada establecida como una cualquiera de las SEQ ID NO. 18, 19, y 21; (b) una secuencias de amino ácido de región variable de cadena pesada que es al menos 83% idéntica a la SEQ ID NO:18; (c) una secuencia de amino ácido de región variable de cadena pesada que es al menos 81% idéntica a la SEQ ID NO:19; o (d) una secuencia de amino ácido de región variable de cadena pesada que es al menos 86% idéntica a la SEQ ID NO:21. Una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-5T4 humanizado funcional (es decir, el anticuerpo anti-5T4 que se une específicamente al antígeno 5T4) se puede codificar mediante (a) un ácido nucleico de una cualquiera de las SEQ ID NO:20, 82, y 83; (b) un ácido nucleico que es al menos 91% idéntico con el ácido nucleico de la SEQ ID NO:20; (c) un ácido nucleico que es al menos 94% idéntico con el ácido nucleico de la SEQ ID NO:82; (d) un ácido que es al menos 91% idéntico con el ácido nucleico de la SEQ ID NO:83; o (e) un ácido nucleico que se hibridiza específicamente al complemento de una cualquiera de las SEQ ID NO:20, 82, y 83 bajo

condiciones de hibridización exigentes, por ejemplo condiciones de lavado final de 0.1 x SSC a 65°C.

El anticuerpo anti-5T4 humanizado puede comprender (a) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de amino ácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:5 y una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de amino ácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:6; (b) una secuencia de amino ácido de cadena ligera de la SEQ ID NO:5 y una secuencia de amino ácido de cadena pesada de la SEQ ID NO:6; (c) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de amino ácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:7 y una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de amino ácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:8; (d) una secuencia de amino ácido de cadena ligera de la SEQ ID NO:7 y una secuencia de amino ácido de cadena pesada de la SEQ ID NO:8; (e) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de amino ácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:9 y una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de amino ácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:10; (f) una secuencia de amino ácido de cadena ligera de la SEQ ID NO:9 y una secuencia de amino ácido de cadena pesada de la SEQ ID NO:10; (g) una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de amino ácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:11 y una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de amino ácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:12; o (h) una secuencia de amino ácido de cadena ligera de la SEQ ID NO:11 y una secuencia de amino ácido de cadena pesada de la SEQ ID NO:12.

Anticuerpos anti-5T4 humanizados de la invención se pueden construir en donde la región variable de una primer cadena (es decir, la región variable de cadena liviana o la región variable de cadena pesada) se humaniza, y en donde la región variable de la segunda cadena no se humaniza (es decir, una región variable de un anticuerpo producido en una especie no humana). Estos anticuerpos se refieren aquí como anticuerpos semi-humanizados. Por ejemplo, un anticuerpo anti-5T4 puede comprender una región variable de cadena liviana humanizada de la SEQ ID NO: 17 o 23, y una región variable de cadena pesada de un anticuerpo 5T4 no humano, tal como la región variable de cadena pesada H8 de murino de la SEQ ID NO: 14. Alternativamente, un anticuerpo anti-5T4 puede comprender una región variable de cadena liviana humanizada de un anticuerpo anti-5T4 no humano, tal como la región variable de cadena liviana H8 de murino de la SEQ N:O 16, y una región variable de cadena pesada humanizada de una cualquiera de la SEQ ID Nos: 18, 19, o 21. Anticuerpos no humanos anti-5T4 diferentes de H8 se pueden utilizar para preparar anticuerpos semi-humanizados, por ejemplo los anticuerpos monoclonales de rata descritos por Woods et al (2002) Biochem. J. 366: 353-65).

Se pueden preparar fácilmente variantes de los anticuerpos anti-5T4 humanizados descritos para incluir varios cambios, sustituciones, instalaciones y eliminaciones, en donde tales cambios suministran ventajas en uso. Por ejemplo, para incrementar la vida media del suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítopo de unión de receptor salvaje, si ya no está presente, dentro de la secuencia de cadena pesada del anticuerpo. Ver patente U.S. No. 5,739,277. Modificaciones

adicionales para mejorar la estabilidad del anticuerpo incluyen la modificación del IgG4 para reemplazar la serina en el residuo 241 con prolina. Ver Angal et al (1993) Mol. Inmunol. 30: 105-108. Otros cambios útiles incluyen sustituciones como se requiere para optimizar la eficiencia en conjugar el anticuerpo con una droga. por ejemplo, un anticuerpo se puede modificar en su terminal carboxilo para incluir aminoácidos para adhesión de droga, por ejemplo se pueden agregar uno o más residuos cisterna. Las regiones constantes se pueden modificar para introducir sitios para unión de carbohidratos u otras porciones.

Variantes de anticuerpos anti-5T4 humanizados de la invención se pueden producir utilizando técnicas recombinantes estándar, que incluyen mutagénesis dirigida al sitio, o métodos de recombinación. Un repertorio diversificado de anticuerpos 5T4 humanizado se pueden administrar por vía de disposición del gen y métodos de conversión de gen en animales no humanos transgénicos (publicación de patente U.S. No. 2003/00117534), que luego se prueban para actividades importantes utilizando ensayos funcionales. En modalidades particulares de la invención, se obtienen variantes anti-T4 utilizando un protocolo de maduración de afinidad tal como la mutación de CDR (Yang et al (1995) J. Mol. Bio 254: 392-403), mezcla de cadena (Marks et al (1992) Biotechnology (NY) 10: 779-783), uso de cepas mutador de E. coli (Low et al (1996)J. Mol. Bio. 260: 359-368), mezcla de ADN (Patten et al (1997)Curr. Opin. Biotechol. 8: 724-733), muestra de fago (Thompson et al. (1996) J. Mol. Bui. 256: 77-88), y PCR sexual (Crameri et al (1998) Nature 391: 288-291). Para aplicaciones de inmunoterapia, ensayos funcionales importantes

incluyen unión específica a antígeno 5T4 humano, internalización del anticuerpo cuando se conjuga con una citotoxina, y objetivar a un sitio de tumor cuando se administra a un animal que tiene tumor, como se describe en los ejemplos. Ver ejemplos 1-11.

La presente invención suministra adicionalmente células y líneas celulares que expresan anticuerpos anti-5T4 humanizados de la invención. Células huésped representativas incluyen células de mamífero y humana, tales como CHO, células HEK-293, células HeLa, células CV-1, células COS. Métodos para generar una línea de células estables luego de transformación de una construcción heteróloga en una célula huésped se conocen en la técnica. Células huésped de mamíferos representativos incluyen células de insectos (Potter et al (1993) Int. Rev. Inmunol. 10(2-3): 103-112). También se pueden producir anticuerpos en animales transgénicos (Houdebine (2002) Curr. Opin. Biotechol. 13(6): 625-629) y plantas transgénicas (Schilberg et al (2003) Cell Mol. Life Sci. 60(3): 433-45).

I.A. Ácidos Nucleicos Anti-5T4 Humanizados y Quiméricos.

La presente invención suministra adicionalmente ácidos nucleicos aislados que codifican regiones variables de cadena pesada y liviana anti-5T4 humanizadas. Los ácidos nucleicos aislados se pueden utilizar para preparar un anticuerpo anti-5T4 humanizado, como se describe aquí.

Los términos molécula de ácido nucleico y ácido nucleico cada una se refiere a desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos o polímeros

de estos en forma de hélice simple, doble hélice y triple hélice. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades similares como la referencia de ácido nucleico natural. Los términos de molécula de ácido nucleico u ácido nucleico también se pueden utilizar en vez de gen, cADN, cARN,o cARN. Los ácidos nucleicos se pueden sintetizar, o se pueden derivar de cualquier fuente biológica, que incluye cualquier organismo. Métodos representativos para clonar ácidos nucleicos que codifican anticuerpos anti-5T4 humanizados se describen en el ejemplo 5.

Ácidos nucleicos representativos de la invención comprende la secuencia de nucleótido de una cualquiera de la SEQ ID Nos: 20, 22, 81, u 83. Ácidos nucleicos de la invención también pueden comprender una secuencia de nucleótido que es sustancialmente idéntica a una cualquiera de la SEQ ID Nos: 20, 22, 81, 82, u 83, por ejemplo, al menos un 91% idéntica a una SEQ ID NOs: 20, 81, u 83, o al menos 90% idéntica a una SEQ ID NO: 22, o al menos 94% a la SEQ ID NO: 82. Se comparan secuencias para correspondencia máxima utilizando un algoritmo de comparación de secuencias de la secuencia de longitud completa de una cualquiera de la SEQ ID NOs: 20, 22, 81, 82, u 83 como la secuencia de consulta, como se describe aquí adelante, o por inspección visual. Ver también ejemplo 5 y tabla 6.

Con respecto a ácidos nucleicos sustancialmente idénticos que tienen un porcentaje de identidad mínimo específico a los ácidos nucleicos de región variable H8 humanizados descritos, las

secuencias sustancialmente idénticas también pueden ser al menos aproximadamente 92% idénticas a la SEQ NO: 20, 81, u 83, tal como al menos 93% idéntica, o al menos 94% idéntica, o al menos 95% idéntica, o al menos 96% idéntica, o al menos 97% idéntica, o al menos 98% idéntica, o al menos 99% idéntica. De forma similar, las secuencias sustancialmente idénticas también incluyen secuencias que son al menos aproximadamente 91% idénticas a la SEQ ID NO: 22, por ejemplo, al menos aproximadamente 92% idéntica, o al menos 93% idéntica, o al menos 94% idéntica, o al menos 95% idéntica, o al menos 96% idéntica, o al menos 97% idéntica, o al menos 98% idéntica, o al menos 99% idéntica; y las secuencias que son al menos 95% idénticas a la SEQ ID NO: 82, tal como al menos 96% idéntica, o al menos 97% idéntica, o al menos 98% idéntica, o al menos 99% idéntica.

Secuencias sustancialmente idénticas pueden ser secuencias polimórficas. El término polimórfico se refiere a la secuencia de dos o más secuencias alternativas determinadas genéticamente o alelos en una población. Una diferencia alélica puede ser tan pequeña como un par base.

Las secuencias sustancialmente idénticas también pueden comprender secuencias mutagenizadas, que incluyen secuencias que comprenden mutaciones silentes. Una mutación puede comprender una o más inoculaciones de residuo, una eliminación de uno o más residuos o una inserción de más residuos adicionales.

También se identifican ácidos sustancialmente idénticos como ácidos nucleicos que hibridizan específicamente a o hibridizan

sustancialmente la longitud completa de una cualquiera de la SEQ ID NOS: 20, 22, 81, 82 y 83 bajo condiciones estrictas. En el contexto de hibridización de ácido nucleico, dos secuencias de ácido nucleico se comparan designando una sonda y un objetivo. Una sonda es una molécula de ácido nucleico de referencia, y un objetivo es una molécula de ácido nucleico de ensayo, a menudo encontradas dentro de una población heterogénea de moléculas de ácido nucleico. Una secuencia objetivo es sinónimo con una secuencia de ensayo.

Una secuencia de nucleótido preferida empleada para estudios de hibridización u ensayos incluyen ensayos de secuencias de sonda que son complementarias con o imitan al menos un aproximadamente 14 a 40 secuencias de secuencias de nucleótido de una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Preferiblemente, la sonda comprende 14 a 20 nucleótidos, o aún mayor en donde se desee, tal como 30, 40, 50, 100, 200, 300, o 500 nucleótidos o hasta la longitud completa de una cualquiera de la SEQ ID Nos: 20, 22, 81, 82, y 83. Tales fragmentos se pueden preparar fácilmente, por ejemplo por síntesis química del fragmento, por aplicación de tecnología de amplificación de ácido nucleico, o al introducir secuencias seleccionadas en los vectores recombinantes para producción recombinante.

La frase hibridizar específicamente a se refiere a la unión, duplexión, o hibridización de una molécula solo para una secuencia de nucleótido particular bajo condiciones estrictas cuando esa secuencia está presente en una mezcla de ácido nucleico compleja (por ejemplo, ADN u ARN celular total).

La frase hibridizar sustancialmente a se refiere a hibridización complementaria entre una molécula completa de ácido nucleico de sonda y una molécula de ácido nucleico objetivo y abarca menores desfases que se pueden acomodar al reducir la restricción del medio de hibridización para lograr la hibridización deseada.

Las condiciones de hibridización estrictas y las condiciones de lavado de hibridización estricto en el contexto de los experimentos de hibridización de ácido nucleico tal como el análisis Southern y Northern blot son independientes de ambiente y secuencia. Las secuencias mayores hibridizan específicamente a temperaturas mayores. Una guía extensiva para hibridización de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Bioloqv- Hvbridization with Nucleic Acid Probes, part I chapter 2, Elsevier, New York, New York. De forma general, la hibridización altamente estricta y las condiciones de lavado se seleccionan por ser aproximadamente 5°C menor que el punto de fusión térmico (T_m)para la secuencia específica en una restricción iónica definida y pH. Típicamente, bajo condiciones estrictas una sonda hibridizará específicamente a su subsecuencia objetivo, pero no a otras secuencias.

La T_m es la temperatura (bajo restricción iónica definida y pH) en la que el 50% de la secuencia objetivo hibridiza a una sonda pareada perfectamente. Se seleccionan condiciones muy estrictas para ser iguales a la T_m para una sonda en particular. Un ejemplo de condiciones de hibridización estrictas para análisis Southern or Northern Blot de ácidos nucleicos complementarios que tienen

más de aproximadamente 100 residuos complementarios es hibridización durante la noche en 50% de formamida con 1 mg de heparina a 42°C. Un ejemplo de condiciones de lavado altamente estrictas es 15 minutos en 0.1X SSC a 65°C. un ejemplo de condiciones de lavado estrictas es 15 minutos 0.2X amortiguador SSC a 65°C. ver Sambrook et al, eds (1999) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, para una descripción del amortiguador SSC. A menudo, un lavado altamente estricto está precedido por un lavado de baja severidad para remover el fondo de señal de fondo. Un ejemplo de condiciones de lavado medianamente estrictas para un dúplex de más de aproximadamente 100 nucleótidos, es 15 minutos en 1X SSC a 45°C. Una muestra de lavado de baja severidad para un dúplex de más de aproximadamente 100 nucleótidos, es 15 minutos en 4X a 6X de SSC a 40°C. para sondas cortas (por ejemplo 10 a 50 nucleótidos) condiciones estrictas típicamente involucran concentraciones de sal de al menos aproximadamente 1M de ión de Na^+, típicamente cerca de 0.01 a 1M de concentración de ión de Na^+ (u otras sales) a pH 7.0-8.3, y la temperatura es típicamente aproximadamente al menos 30°C. también se pueden lograr condiciones estrictas con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. En general, una señal para índice de ruido de dos veces (o mayor) que aquella observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridización particular que indica la detección de una hibridización especifica.

Los siguientes son ejemplos de hibridización y condiciones de lavado que se pueden utilizar para identificar secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas a las secuencias de

nucleótidos de referencia de la presente invención: una secuencia de nucleótido de sonda preferiblemente hibridiza a una secuencia de nucleótido objetivo en 7% de sulfato dodecilo de sodio (SDS), 0.5 M $NaPO_4$, 1mM EDTA a 50°C seguido por lavado en 2X SSC, 0.1% SDS a 50°c; más preferiblemente, una secuencia de sonda y objetivo hibridizan en 7% de sulfa sulfato dodecilo de sodio (SDS), 0.5 M $NaPO_4$, 1mM EDTA a 50°C seguido por lavado en 1X SSC, 0.1% SDS a 50°C; más preferiblemente, una secuencia de sonda y objetivo hibridiza en 7% de sulfato dodecilo de sodio (SDS), 0.5 M $NaPO_4$, 1mM EDTA a 50°C seguido por lavado en 0.5X SSC, 0.1% SDS a 50°C;

mas preferiblemente, una secuencia de sonda y objetivo hibridizan en 7% de sulfato dodecilo de sodio (SDS), 0.5 M $NaPO_4$, 1mM EDTA a 50°C seguido por lavado en 0.1X SSC, 0.1% SDS a 50°C; más preferiblemente, una secuencia de sonda y objetivo hibridizan en 7% de sulfato dodecilo de sodio (SDS), 0.5 M $NaPO_4$, 1mM EDTA a 50°C seguido por lavado en 0.1X SSC, 0.1% SDS a 65°C.

Una indicación adicional que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las proteínas codificadas por los ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas, comparten una estructura general tridimensional, o son equivalentemente funcionales. Estos términos se definen aquí adicionalmente adelante. Las moléculas de ácido nucleico que no hibridizan la una a la otra bajo condiciones estrictas son aún sustancialmente idénticas si las proteínas correspondientes son sustancialmente idénticas. esto puede ocurrir, por ejemplo, cuando las secuencias de dos nucleótidos comprenden variantes sustituidas de forma conservadora como se permite mediante el código genético.

El término variantes conservadoramente sustituidas se refiere a secuencias de ácido nucleico que tienen sustituciones de codón degenerado en donde la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituyen con residuos desoxiinosina y/o mezcla-base. Ver, Batzer et al. (1991) Nucleic Acids Res. 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608; and Rossolini et al. (1994) MoI. Cell Probes 8:91 -98. Los ácidos nucleicos de la invención también comprenden ácidos nucleicos complementarios con cualquiera de la SEQ ID NOs:20, 22, 81 , 82, y 83, y subsecuencias alargadas de los ácidos nucleicos y ácidos nucleicos de complemento de una cualquiera de SEQ ID NOs:20, 22, 81 , 82, and 83. El término secuencias complementarias como se utiliza aquí, indica dos secuencias de nucleótidos que comprenden secuencias de nucleótido antiparalelas capaces de aparearse con otra luego de la formación de enlaces de hidrógeno entre los pares base. Como se utiliza aquó, el término secuencias complementarias significa secuencias de nucleótidos que son sustancialmente complementarias, cuando pueden ser evaluadas por los mismos métodos de comparación de nucleótidos establecidos adelante, o si se definen por ser capaces de hibridizar al segmento de ácido nucleico en cuestión bajo condiciones relativamente estrictas tales como aquella descritas aqui. Un ejemplo particular de segmento de ácido nucleico complementario es un oligonucleótido antisentido. El término subsecuencia se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende una parte de una secuencia de ácido nucleico mayor. Una subsecuencia de ejemplo es una sonda, descrita aquí anteriormente, o un iniciador. El término iniciador como se utiliza aquí se refiere a

una secuencia contigua que comprende aproximadamente 8 o más desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos, preferiblemente 10-20 nucleótidos, y más preferiblemente 20-30 nucleótidos de una molécula de ácido nucleico seleccionada. Los iniciadores de la invención abarcan oligonucleótidos de suficiente longitud y secuencia apropiada de tal forma que suministran iniciación de polimerización en una molécula de ácido nucleico de la presente invención.

El término secuencias alargadas se refiere a una adición de nucleótidos (u otras moléculas análogas) incorporadas en el ácido nucleico. Por ejemplo, una polimerasa (por ejemplo una polimerasa ADN) puede agregar secuencias en el terminal 3' de la molécula de ácido nucleico. Adicionalmente, la secuencia de nucleótidos se puede combinar con otras secuencias de ADN tal como promotores, regiones promotor, mejoradores, señales de poliadenilación, secuencias intrónicas, sitios de enzimas de restricción adicional, sitios de clonación múltiples y otros segmentos de codificación. Así, la invención también suministra vectores que comprenden los ácidos nucleicos descritos, que incluyen vectores para expresión recombinante, en donde un ácido nucleico de la invención se liga operativamente a un promotor funcional.

El término ligado operativamente, como se utiliza aquí, se refiere a una combinación funcional entre una región promotora y una secuencia de nucleótido de tal forma que la transcripción de la secuencia de nucleótido se controla y regula por la región promotora. Las técnicas para ligar operativamente una región promotora a una secuencia de nucleótido se conocen en la técnica.

El término vector se utiliza aquí para referirse a una molécula de ácido nucleico que tiene secuencias de nucleótido que permiten su replicación en una célula huésped. Un vector puede también incluir secuencias de nucleótido para permitir la ligación de secuencias de nucleótido dentro del vector, en donde tales secuencias de nucleótido también se replican en una célula huésped. Vectores representativos incluyen plásmidos, cósmicos y vectores virales.

Ácidos nucleicos de la presente invención se pueden clonar, sintetizar, alterar, mutagenizar o combinaciones de estos. Técnicas de clonación molecular y de ADN recombinante estándar utilizadas para aislar ácidos nucleicos se conocen en la técnica. La mutagénesis específica de sitio para crear cambios de pares bases, eliminaciones o inserciones pequeñas también se conocen en la técnica. Ver por ejemplo, Sambrook et al. (eds.) (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Silhavy et al. (1984) Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover & Hames (1995) DNA Cloning: A Practical Approach. 2nd ed. IRL Press at Oxford University Press, Oxford/New York; Ausubel (ed.) (1995) Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. Wiley, New York.

I.B. Polipéptidos Anti-5T4 humanizado y Quimérico

La presente invención también suministra polipéptidos anti-5T4 humanizados aislados. Polipéptidos de cadena liviana y de cadena

pesada representativos de la invención se establecen como SEQ ID NOs:1-12. El polipéptido de región variable de cadena liviana representativo y polipéptido de región variable de cadena liviana se establecen como SEQ ID NOs:17 y 23 y SEQ ID NOs:18, 19, y 21, respectivamente.

Los términos polipéptido y proteína cada uno se refiere a un compuesto de una cadena sencilla de aminoácidos unidos por enlaces péptido. Los anticuerpos de la invención se refieren alternativamente como polipéptidos o proteínas. Los polipéptidos de la presente invención pueden comprender aminoácidos de ocurrencia natural, aminoácidos sintéticos, aminoácidos codificados genéticamente, aminoácidos no codificados genéticamente, y combinaciones de estos. Los polipéptidos pueden incluir aminoácidos de la forma L y forma D.

Aminoácidos codificados no genéticamente representativos incluyen pero no se limitan a ácido 2-aminoadípico; ácido 3-aminoadípico; ácido β-aminopropiónico; ácido 2-aminobutírico; ácido 4-aminobutírico (ácido piperidínico); ácido 6-aminocaproico; ácido 2-aminoheptanoico; ácido 2-aminoisobutírico; ácido 3-aminoisobutírico; ácido 2-aminopimélico; ácido 2,4-diaminobutírico; desmosina; ácido 2,2`-diaminopimélico; ácido 2,3-diaminopropiónico; N-etilglicina; N-etilasparagina; hidroxilisina; alo-hidroxilisina; 3-hidroxiprolina; 4-hidroxiprolina; isodesmosina; alo-isoleucina; N-metilglicina (sarcosina); N-metilisoleucina; N- metilvalina; norvalina; norleucina; y ornitina.

Aminoácidos derivados y representativos incluyen, por ejemplo, aquellas moléculas en las que grupos amino libres se han derivado para formar clorhidratos amina, grupos de p-tolueno sulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo se pueden derivar para formar sales, ésteres de metilo y etilo u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Grupos hidroxilo pueden formar derivados O-acilos u O-alquilo. El nitrógeno Imidazol de histidina se puede derivar para formar N-im-bencilhistidina.

La presente invención también suministra fragmentos funcionales de un polipéptido anti-5T4 humanizado, por ejemplo, un polipéptido de región variable. Las secuencias de polipéptido funcional que son mayores que las secuencias descritas también se suministran. Por ejemplo, uno o más aminoácidos se pueden agregar al N-terminal o C-terminal de un polipéptido anticuerpo. Tales aminoácidos adicionales se pueden emplear en una variedad de aplicaciones, que incluyen pero no se limitan a aplicaciones de purificación. Métodos para preparar proteínas alargadas se conocen en la técnica.

Los polipéptidos de la invención incluyen (a) un polipéptido de región variable de cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 17 o 23; (b)un polipéptido de región variable de cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 78% idéntica a la SEQ ID NO:17 y (c) un polipéptido de región variable de cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácido de al menos 81% idéntica a la SEQ ID NO: 23. Polipéptidos adicionales de la invención incluyen (a) un

polipéptido de región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácido establecida como una cualquiera de la SEQ ID NO: 18, 19 y 21 (b) un polipéptido de región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 83% idéntica a la SEQ ID NO: 18; (c) un polipéptido de región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 81% idéntica a la SEQ ID NO: 19 y (d) un polipéptido de región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos 86% idéntica a la SEQ ID NO:21. Las secuencias se comparan para máxima correspondencia utilizando un algoritmo de comparación de secuencia que utiliza una secuencia de longitud completa de una cualquiera de la SEQ ID NO: 17, 18, 19, 21, o 23 como la secuencia de consulta, como se describe aquí adelante, o por inspección visual. Ver también ejemplo 5.

Con respecto a polipéptidos sustancialmente idénticos que tienen un porcentaje de identidad específico mínimo para los polipéptidos de región variable H8 humanizados descritos, polipéptidos sustancialmente idénticos también pueden ser de al menos 87% idénticos de una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de la SEQ ID NO: 17, 18, 19, 21, o 23, tal como al menos 88% idéntico, o al menos 89% idéntico, o al menos 90% idéntico, o al menos 91% idéntico, o al menos 92% idéntico, o al menos 93% idéntico, o al menos 94% idéntico, o al menos 95% idéntico, o al menos 96% idéntico, o al menos 97% idéntico, o al menos 98% idéntico, o al menos 99% idéntico. La invención abarca adicionalmente polipéptidos codificados por uno cualquiera de los ácidos nucleicos descritos aquí.

Proteínas sustancialmente idénticas también incluyen proteínas que comprenden aminoácidos que son variantes conservadoramente sustituidas de una cualquiera de los polipéptidos de región variable humanizados descritos y anticuerpos de región variable. El término variante conservadoramente sustituida se refiere a un polipéptido que comprende un aminoácido en el que uno o más residuos se han sustituido de forma conservadora con un residuo funcionalmente similar y que se une específicamente al anti-5T4 humano con afinidad similar como cualquiera de los anticuerpos H-8 humanizados y quiméricos descritos. La frase variante conservadoramente sustituida también incluye péptidos en donde se reemplaza un residuo con un residuo químicamente derivado.

Ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo no polar (hidrófobo) tal como isoleucina, valina, leucina o metionina para otro; la sustitución de un residuo polar (hidrofílico) para otro como tal entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre glicina y serina; la sustitución de un residuo básico tal como lisina, arginina e histidina para otro; o la sustitución de un residuo acídico, tal como ácido aspártico o ácido glutámico para otro.

Polipéptidos aislados de la invenciones pueden purificar y caracterizar utilizando una variedad de técnicas estándar que se conocen por el experto. Ver por ejemplo, Schroder & LÜbke (1965) The Peptides. Academic Press, New York; Bodanszky (1993) Principles of Peptide Synthesis. 2nd rev. ed. Springer- Verlag,

Berlin/ New York; Ausubel (ed.) (1995) Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. Wiley, New York.

I.C. Comparaciones de secuencia de Aminoácido y Nucleótido

Los términos idénticos o porcentaje de identidad en el contexto de dos o más nucleótidos o secuencia de polipéptido, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma o tienen un porcentaje específico de residuos aminoácidos o nucleótidos que son los mismos, cuando se comparan y se alinean para máxima correspondencia, cuando se mide utilizando uno de los algoritmos de comparación de secuencias descritos aquí o por inspección visual.

El término sustancialmente idéntico con respecto a una secuencia de nucleótido o polinucleótido significa que una secuencia particular varía de la secuencia de una secuencia de ocurrencia natural por una o más eliminaciones, sustituciones o adiciones, el efecto neto de que es una función de retención biológica de un ácido nucleico anti-5T4 humanizado o polipéptido.

Para comparación de dos o más secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia a la que una o más secuencias de ensayo se comparan. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencia, se ingresan las secuencias de referencia y ensayo en un programa de computador, se diseñan coordenadas de subsecuencia si es necesario, y se selecciona los parámetros de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia luego calcula el porcentaje de identidad de

secuencia para la secuencia de ensayo designada con relación a la secuencia de referencia, basado en los parámetros de programas seleccionados.

La alineación óptima de las secuencias para comparación se pueden conducir, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman (1981) Adv. Appl. Math 2:482-489, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch (1970) J. MoI. Biol. 48:443-453, mediante la búsqueda por el método de similitud de Pearson & Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. ScL USA 85:2444-2448, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), o por inspección visual. Ver de forma general, Ausubel (ed.) (1995) Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. Wiley, New York. Un algoritmo preferido para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similaridad de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al. (1990) J. MoI. Biol. 215:403-410. Software para desarrollar análisis BLAST está disponible públicamente a través del National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Los parámetros del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. Para comparación de dos secuencias de nucleótido, los parámetros por defecto del BLASTn se establecen en el parámetrot W=11 (longitud de palabras) y E=10 (expectativas), y también incluye el uso de un filtro de baja complejidad para enmascarar residuos de la secuencia de consulta que tiene baja complejidad de comporsición. Para comparación de dos secuencias de aminoácido,

por defecto del programa BLASTp se establecen en W=3 (longitud de palabra), E=10 (expectativa), uso de la matriz de clasificación BLOSUM62, costo de espacio de existencia = 11 y extensión = 1, y uso del filtro de baja complejidad para enmascarar residuos de la secuencia de consulta que tiene baja complejidad composicional. Ver Ejemplo 5.

I.D. Ensayos Funcionales

La presente invención describe adicionalmente ensayos in Vitro e in vivo para caracterizar actividades de un anticuerpo anti-5T4, que incluye la actividad de unión del 5T4, internalización celular luego de unión al antígeno 5T4 presentado en una superficie celular, y objetivar a las células que expresan 5T4 en un sujero. Cuando se conjuga con una citotoxina, los anticuerpos descritos de la invención pueden elicitar enfermedad anticáncer, que incluye la inhibición de crecimiento de células de cáncer que expresan 5T4 y/o la inducción de muerte celular en células que expresan 5T4. Anticuerpos 5T4 humanizados de la invención pueden comprendr uno o más de las anteriores actividades.

Técnicas para detectar la unión de anticuerpos 5T4 humanizados al antígeno 5T4 se conocen en la técnica, que incluyen por ejemplo, ensayos BIACORE® como se describe en el ejemplo 5. Técnicas representativas adicionales incluyen la centrifugación, cromatografía de afinidad y otros métodos inmunoquímicos. Ver por ejemplo, Manson (1992) Immunochemical Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey, United States of America; Ishikawa (1999) Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay. Elsevier,

Amsterdam/New York. Los ensayos de unión a antígeno se pueden desarrollar utilizando el antígeno 5T4 o células que expresan 5T4. ver ejemplos 1 5.

El término actividad anticáncer se utiliza para describir generalmente una capacidad para destruir células de cáncer existentes, o retrasar o evitar el crecimiento de células de cáncer. El término cáncer se refiere a tumores que han hecho metástasis y primarios y carcinomas de cualquier tejido en un sujeto que incluyen carcinomas y malignidades hematopoyéticas tal como leucemias y linfomas. Los ensayos in Vitro para determinar la actividad anticáncer se describen en los Ejemplos 2 y 8, y los modelos animales representativos se describen en los ejemplos 3, 4, y 9. El término inhibidor de crecimiento se utiliza aquí para describir una capacidad de los anticuerpos anti-5T4 para eliminar células que expresan el 5T4 y evitar o reducir la proliferación de células que expresan el 5T4. Como se describe en los ejemplos 2-4 y 8-9, los anticuerpos anti-5T4 humanizados de la invención pueden inhibir el crecimiento de células de cáncer. Métodos representativos adicionales para evaluación in Vitro rápida de la inhibición de crecimiento celular se describen en Jones et al. (2001) J. Immunol. Methods 254:85-98.

Una capacidad par inducir la muerte celular incluye la inducción programada de muerte celular, que incluye la degradación de ADN nuclear, degradación nuclear y condensación, pérdida de integridad de membrana, y fagocitosi. Ensayos representativos para evaluar células se describen en Hoves et al. (2003) Methods

31 :127-34; Peng et al. (2002) Chin. Med. ScL J. 17:17-21; Yasuhara et al. (2003) J. Histochem. Cytochem. 51 :873-85.

II. conjugados de anticuerpo Anti-5T4 / Drogas.

La presente invención suministra adicionalmente conjugados de anticuerpo/droga que comprende un anticuerpo 5T4 humanizado o quimérico de la invención. También se suministran métodos para preparar los conjugados de anticuerpo/droga, de tal forma que la droga se une al anticuerpo ya sea directa o indirectamente. Los conjugados de anticuerpos /droga de la invención tienen la fórmula general 5T4 (-X-W)m en donde: el 5T4Ab es un anticuerpo anti-5T4 humanizado o quimérico o fragmento de anticuerpo descrito aquí;

X es un ligador que comprende un grupo de cualquier grupo reactivo que puede reaccionar con un anticuerpo 5T4 de fragmento de anticuerpo;

W es una droga;

m la carga promedia para un producto de conjugación purificado (por ejemplo., m de tal forma que la droga constituye aproximadamente 3 - 10% del conjugado por peso); y
(-X-W)m es un derivado de droga.

También se suministran métodos para preparar conjugados anticuerpos/droga de la invención. Como un ejemplo, el conjugado anticuerpo/droga de la fórmula 5T4 (-X-W)m se pueden preparar al

(a) al agregar el derivado de droga al anticuerpo anti-5T4 humanizado o quimérico en donde la droga es 3-10% en peso del anticuerpo anti-5T4 humanizado o quimérico; (b) incubar el derivado de droga y el anticuerpo anti-5T4 humanizado o quimérico en una solución amortiguada, no nucleofílica, compatible con proteínas, que tiene un pH de rango aproximadamente 7 a aproximadamente 9 para producir un conjugado de anticuerpo/droga en donde la solución comprende adicionalmente (i) un cosolvente orgánico adecuado, y (ii) uno o más aditivos que comprenden al menos un ácido de bilis o su sal, y en donde la incubación se conduce en una temperatura que varía de aproximadamente 30°C a 35°C durante un periodo de tiempo que varía de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 24 horas; (c) someter el conjugado producido en la etapa (b) a un proceso de separación cromatográfico para separar los conjugados de anticuerpo/droga con una carga en el rango de 3-10% en peso de droga y con baja fracción de conjugado (LCF) de anticuerpo anti-5T4 humanizado o quimérico no conjugado, derivado de droga, y conjugados agregados.

II.A. Drogas

El término droga a como se utiliza aquí se refiere a cualquier sustancia que tiene actividad biológica o detectable, por ejemplo agentes terapéuticos, etiquetas detectables, agentes de unión, etc., y prodrogas, que se metabolizan con un agente activo in vivo. El término droga también incluye derivados de drogas, en donde una drogas se ha funcionarizado para permitir la

conjugación con un anticuerpo de la invención. De forma general, estos tipos de conjugados se refieren como inmunoconjugados.

El término agente terapéutico se refiere a cualquier composición que se puede utilizar para tratar o evitar una condición en un sujeto en necesidad de este. En particular, las drogas útiles en la invención incluirán drogas anticáncer. Células que expresan el 5T4 incluyen células de cáncer de carcinoma de pulmón escamoso/endomatoso (carcinoma de pulmón de célula no pequeña), carcinoma de mama invasivo, carcinoma colon rectal, carcinoma gástrico, carcinoma cervical escamoso, adenocarcinoma endometrial invasivo, carcinoma de páncreas invasivo, carcinoma de ovario, carcinoma de vesícula escamosa y coriocarcinoma.

Drogas terapéuticas representativas incluyen citotoxinas, radioisótopos, agentes quimioterapéuticos, agentes inmunomoduladores, agentes anti-angiogénicos, agentes anti-proliferativos, agentes proapoctóticos, y enzimas citoestáticas y citolíticas (por ejemplo RNAsas). Una droga también puede incluir un ácido nucleico terapéutico, tal como un gen que codifica un agente inmunomodulador, un agente antiangiogénico, un agente antiproliferativo, o un agente apoptótico. Estas drogas y descripciones no son exclusivamente mutuales, y así un agente terapéutico se puede describir utilizando uno o más de los términos anotados anteriormente. Por ejemplo, radioisótopos seleccionados son también citotoxinas. Agentes terapéuticos se pueden preparar como sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o bivalentes de cualquiera de los anteriores. De forma general los conjugados que tienen un radioisótopo como la droga se refieren

como radioinmunoconjugados y aquellos que tienen un agente quimioterapéutico como la droga se refieren aquí como quimioinmunoconjugados.

Ejemplos de drogas adecuadas para uso en inmunoconjugados incluyen los taxanos, maitansinas, CC-1065 y las duocarmicinas, las caliqueamicinas y otras enediinas, y las auristatinas. Otros ejemplos incluyen los anti-folatos, alcaloides vinka, y las antraciclinas. Toxinas de plantas, otras proteínas bioactivas, enzimas (por ejemplo, ADEPT), radioisótopos, fotosensibilizadores (es decir, para terapia fotodinámica) también se pueden utilizar en inmunoconjugados.Adicionalmente, los conjugados se pueden hacer utilizando portadores secundarios como agentes citotóxicos, tal como liposomas o polímeros.

El término citotoxina generalmente se refiere a un agente que inhibe o evita la función de células y/o resulta en la destrucción de células. Citotoxinas representativas incluyen antibióticos, inhibidores de polimerización de tubulina, agentes de alquilación que se unen a e interrumpen el ADN, y agentes que interrumpen la síntesis de proteína o las funciones de proteínas celulares esenciales tal como proteínas quinasas, fosfatasas, topoisomerasas, enzimas, y ciclinas. Citotoxinas representativas incluyen, pero no se limitan a, doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, aclarubicina, zorubicina, mitoxantrona, epirubicina, carubicina, nogalamicina, menogaril, pitarubicina, valrubicina, citarabina, gencitabina, trifluridina, ancitabina, enocitabina, azacitidina, doxifluridina, pentostatina, broxuridina, capecitabina, cladribina, decitabina, floxuridina, fludarabina,

gougerotina, puromicina, tegafur, tiazofurina, adriamicina, cisplatina, carboplatina, ciclofosfamida, decarbazina, vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, procarbazina, metotrexato, flúoruracilos, etoposida, taxol, análogos taxol, platinas, tales como cis-platinaa y Carbo-platina, mitomicina, tiotepa, taxanos, vincristina, daunorubicina, epirubicina, actinomicina, autramicina, azaserinas, bleomicinas, tamoxifen, idarubicina, dolastaninas/auristatinas, hemiasterlinas, esperamicinas y maitansinoides.

En modalidades particulares de la invención, la citotoxina es un antibiótico tal como caliqueamicina, también llamado el complejo LL-E33288, por ejemplo, gama-caliqueamicina (γi). Ver patente U.S. No. 4,970,198. Estudios anteriores con conjugados de anticuerpo derivados de hidrazida gama caliqueamicina muestran citotoxidad basada en antígeno in Vitro y actividad en experimentos de xenoinjerto. El índice terapéutico de estos conjugados se mejora inicialmente al utilizar un derivado menos potente, gama N-acetilo. Estabilizar el enlace disulfuro que está presente en todos los conjugados caliqueamicina al agregar sustituyentes dimetilo hacen mejoras adicionales. Ejemplos adicionales de caliqueamicinas adecuadas para preparar conjugados de anticuerpos/droga de la invención se describe en las patentes estadounidenses Nos. 4,671,958; 5,053,394; 5,037,651 ; 5,079,233;y 5,108,912; que se incorporan aquí en su totalidad. Estos compuestos contienen un metiltrisulfuro que se puede hacer reaccionar con tioles apropiados para formar disulfuros, al mismo tiempo introducir un grupo funcional tal como hidrazida u otro

grupo funcional que es útil paara conjugar la caliqueamicina a un anticuerpo anti-5T4. Estabilizar el enlace de disulfuro que está presente en todos los derivados de caliqueamicina al agregar sustituyentes de dimetilo hacen mejoras adicionales. Esto conduce a la elección de la hidrazida dimetilo gama caliqueamicina N-acetilo o NAc-gama DMH (CL-184,538), como uno de los derivados optimizados para conjugación. Análogos de disulfuro de caliqueamicina también se pueden utiliar, por ejemplo, análogos descritos en la patente U.S. Nos. 5,606,040 y 5,770,710, que se incorporan aquí en su totalidad

Para aplicaciones de radioterapia, un anticuerpo anti-5T4 humanizado o quimérico de la invención pueden comprender un radioisótopo de alta energía. El isótopo puede estar unido directamente al anticuerpo por ejemplo, en un residuo cisterna presente en el anticuerpo, o un quemador puede ser utilizado para mediar la unión del anticuerpo y el radioisótopo. Radioisótopos adecuados para radioterapia incluyen pero no se limitan a α-emisores, β-emisores, y electrones auger. Para aplicaciones diagnósticas, radioisótopos útiles incluyen emisores de positron y γ-emisores. Un anticuerpo anti-5T4 humanizado de la invención se puede yodinar adicionalmente, por ejemplo en un residuo tiroxina del anticuerpo, para facilitar la detección o efecto terapéutico del anticuerpo.

Radioisótopos radioactivos que se pueden conjugar con un anticuerpo anti-5T4 incluyen ^{18}flúor, ^{64}cobre, ^{65}cobre, ^{67}galio, ^{68}galio, ^{77}Bromo, ^{80}bromo, ^{95}rutenio, ^{97}rutenio, ^{103}rutenio, ^{105}rutenio, ^{99m}teccenio, ^{107}mercurio, ^{203}mercurio, ^{123}Yodo, ^{124}Yodo,

^{125}Yodo, ^{126}Yodo, ^{131}iYodo, ^{133}Yodo, ^{111}Indio, ^{113}Indio, ^{99m}Renio, ^{105}Renio, ^{101}renio, ^{186}renio, ^{188}renio, ^{121}teluro, ^{99}tecnecio, ^{122m}telurio, ^{125m}telurio, ^{165}tulio, ^{167}tulio, ^{168}tulio, ^{90}Iterio, y formas de nitruro u óxido derivadas de estos. Otros radioisotopos adecuados incluyen emisores alfa tal como ^{213}bismuth, ^{213}plomo, y ^{225}actinio.

La angiogénesis y la respuesta inmune suprimida juegan un papel central en la patogénesis de enfermedades malignas y crecimiento de tumor, invasión, y metástasis. Asi, drogas útiles en los métodos de la presente invención tambien incluyen aquellas capaces de inducir una respuesta inmune y/o una respuesta anti-angiogénica in vivo.

El termino respuesta inmune significa que se refiere a cualquier respuesta a un antígeno o antigénica determinante por el sistema inmune de un sujeto vertebrado, que incluye respuesta inmune humoral (por ejemplo producción de anticuerpos específicos de antígeno) y respuesta inmune medidas por células (por ejemplo proliferación de linfocitos). Agentes inmunomoduladores representativos incluyen citoquinas, santinas, interleuquinas, interferones, y factores de crecimiento (por ejemplo, TNF, CSF, GM-CSF y G-CSF), y hormonas tales como estrógenos (dietilestilbestrol, estradiol), androgénos (testosterona, HALOTESTIN® (fluoximesterona)), progestinas (MEGACE® (megestrol acetato), PROVERA® (acetato de medroxiprogesterona)), y corticosteroides (prednisona, dexametasona, hidrocortisona).

Agentes inmunomoduladores útiles en la invención también incluyen anti-hormonas que bloquean la acción de la hormona sobre lo tumores y agentes inmunosupresores que suprimen la producción de citoquinas, regulan de forma negativa la expresión de autoantígeno, o enmascaran antígenos MCH. Anti-hormonas representativas incluyen anti-estrógenos que incluyen por ejemplo tamoxifen, raloxifeno, aromatasa que inhibe 4(5)-imidazoles, 4-hidroxitamoxifen, trioxifen, ceoxifeno, LY117018, onapnstona, y toremifeno; y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolide, y goserelina; y agentes anti-adrenales. Agentes inmunosupresores representativos incluyen pirimidinas 2-amino-6-aril-5-sustituido, azatioprina, ciclofosfamida, bromocriptina, danazol, dapsona, glutaraldehído, anticuerpos anti-idiotípicos para antígenos MCH y fragmentos MCH, ciclosporina A, esteroides tales como glucocorticosteroides, citoquina o antagonistas del receptor citoquina (por ejemplo, anticuerpo anti-interferón, anticuerpos anti-IL.10, anticuerpos anti-TNFα, anticuerpos anti-IL2), estreptoquinasa, TGFβ, rapamicina, receptor de células T, fragmentos de receptores de célula T, y anticuerpos del receptor de célula T.

Agentes anti-angiogenicos representativos incluyen inhibidores de formación de vasos sanguíneos, por ejemplo, inhibidores de farnesiltransferasa, inhibidores de COX-2, inhibidores VEGF, inhibidores bFGF, inhibidores de sulfatasa esteroide (por ejemplo, 2-metoxioestradiol bis-sulfamato (2-MeOE2bisMATE)), interleuquina-24, trombospondina, proteínas metallospondina, interferones clase I, interleuquina 12, protamina, angiostatina, laminina, endostatina, y fragmentos de

prolactina. Agentes anti-proliferativos y agentes pro-apoptoticos incluyen activadores de PPAR-gamma (por ejemplo, prostaglandinas ciclopentanona (cyPGs)), retinoides, triterpinoides (por ejemplo, cicloartano, lupano, ursano, oleanano, friedelano, dammarano, cucurbitacina, y triterpenoides limonoide), inhibidores del receptor EGF (por ejemplo, HER4), rampamicina, CALCITRIOL® (1,25-dihidroxicolecalciferol (vitamin D)), inhibidores de aromatasa (FEMARA® (letrozone)), inhibidores de telomerasa, quemadores de hierro (por ejemplo, 3-aminopiridino-2-carboxaldehído tiosemicarbazona (Triapine)), apoptina (proteína viral 3-VP3 de virus de anemia de pollo), inhibidores de Bcl-2 y BcI-X(L), TNF-alfa, ligando FAS, ligando que induce apoptosis relacionada con TNF (TRAIL/Apo2L), activadores de ligando que induce a apoptosis relacionada con ligando/TNF TNF-alfa/FAS (TRAIL/Apo2L) señalización, e inhibidores de señalización de senda de supervivencia P13K-Akt (por ejemplo, UCN-01 y geldanamicina).

Agentes quimioterapeuticos representativos incluyen agentes alquilatantes tales como tiotepa y ciclofosfamida; sulfonatos alquilo tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziidinas tales como benzodopa, carboquone, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosforamida y trimetilolomelamina; mostaza de nitrógeno tal como clorambucil, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mequioretamina, clorhidrato de óxido de mequioretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfarnida, mostaza uracilo; nitrosureas tales

como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina, mitomicinas, ácido micofenolico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tal como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-EU; andrógenos tales como calusterona, propionato dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenal tal como arninoglutetimida, mitotano, trilostano; rellenadores de ácido fólico tal como ácido frolinico; aceglatona; glicosida aldofosfarnida; (ácido aminolevulinico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquona; elfornitina; acetato de elliptinio; etoglucida; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofillinico; 2-etilhidrazida; procarbazina; razoxano; sizofiran; espirogermanio; (ácido tenuazonico; triaziquona; 2,2',2'-triclorotrietilamina; uretan; vindesina; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol;

pipobroman; gacitosina; arabinosida (Ara-C); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology of Princeton, New Jersey) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer de Antony, Francia); quiorambucil; gencitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tal como cisplatina y carboplatina; vinblastina; platino; etoposida (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposida; daunomicina; aininopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11 ; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; y capecitabina.

Agentes terapéuticos adicionales que se pueden conjugar con anticuerpos anti-5T4 humanizados y quiméricos descritos aquí y utilizados de acuerdo con los métodos terapéuticos de la presente invención incluyen pero no se limitan a agentes fotosensibilizadores (Publicación de Patente Estadounidense No. 2002/0197262 y Patente Estadounidense No. 5,952,329) para terapia foto dinámica; partículas magnéticas para termoterapia (Publicación de Patente Estadounidense No. 2003/0032995); agentes de unión, tal como péptidos, ligandos, ligandos de adhesión celular, etc., y prodrogas tales como prodrogas que contienen fosfatos, prodrogas que contienen tiofosfato, prodrogas que contienen sulfato, prodrogas que contienen péptido, prodrogas que contienen β-lactama, prodrogas que contienen fenoxiacetamida sustituida o prodrogas que contienen fenilacetamida sustituida, prodrogas 5-fluorocitosina y otras prodrogas 5-fluorouridina que se pueden convertir a la droga libre más citotóxica activa.

Métodos para diagnostico que utilizan anticuerpos anti-5T4 humanizados o quiméricos, una droga puede comprender una etiqueta detectable que se puede utilizar para detectar la presencia de células que expresan 5T4- in vitro o in vivo. Los radioisotopos útiles para aplicaciones de diagnostico clinico incluyen etiquetas que son detectables in vivo, tal como aquellas etiquetas que son detectables utilizando sintigrafía, formación de imágenes de resonancia magnética, o ultrasonido. Etiquetas sintigraficas incluyen emisores de pulsitrones y emisores γ. Agentes de contraste representativos para formación de imagen de fuente magnetica son iones para magnéticos o súper paramagnéticos (por ejemplo, hierro, cobre, maganeso, cromo, erbio, europio, disprosio, holmio y gadolinio), partículas de óxido de hierro, y agentes de contraste solubles en agua. Para detección ultrasónica se pueden atrapar líquidos o gases en partículas inorgánicas porosas que se liberan como agentes de contraste de microburbuja. Para la detección in Vitro, etiquetas detectables útiles incluyen un fluoroforo, un epitopo, o una etiqueta radioactiva.

II. B. Moléculas Ligadoras

Se conjugan drogas a anticuerpos anti-5T4 humanizados y quiméricos de la invención ya sea directa o indirectamente por vía de una molécula ligadora. La molécula ligadora puede ser estable o hidrolisable, por lo cual esta se libera luego de la entrada celular. El mayor mecanismo al que la droga se cliva a partir del anticuerpo incluye hidrólisis en el pH acídico de los lisosomas (hidrazonas, acetales, y amidas similares a cis-aconitato), clivaje de péptido por enzimas lisosomales (las

catepsinas y otras enzimas lisosomales), y la reducción de disulfuros. Como un resultado de estos varios mecanismos para clivaje, los mecanismos de ligado de la droga al anticuerpo tambien varían ampliamente y cualquier ligador adecuado se puede utilizar. Preferiblemente, el método de conjugación produce una muestra con fracción de conjugado bajo mínimo (LCF, la fracción de anticuerpo mayormente no conjugada), es decir menos de aproximadamente 10%.

Un ejemplo de un procedimiento de conjugación adecuado descansa en la conjugación de hidrasidas y otros nucleofidos a los aldehídos generados por la oxidación de los carbohidratos que ocurren naturalmente en los anticuerpos. Los conjugados que contienen hidrazona se pueden hacer con grupos carbonilo introducido que suministran las propiedades de liberación de droga deseada. Los conjugados también se pueden caber con un ligador que tiene un disulfuro en un extremo, y una cadena alquilo en la mitad, y un derivado hidrazida en el otro extremo. Las antraciclinas son un ejemplo de citotoxinas que se pueden conjugar con anticuerpos que utilizan esta tecnología.

Ligadores que contienen grupos funcionales diferentes de hidrazonas tienen el potencial de ser clivados en el miliu acidico de los lisosomas. Por ejemplo, los conjugados se pueden se pueden hacer a partir de ligadores reactivos altiol que contienen un sitio diferente de hidrazona que es clivable intracelularmente, tal como ésteres, amidas, y acetales/cetales. La camptotecina es un agente citotóxico que se puede conjugar utilizando estos ligadores. Los cetales hechos de cetona de

anillo de 5 a 7 miembros y que tiene uno de los oxígenos adheridos al agente citotóxico y el otro a un ligador de adhesión de anticuerpo también se puede utilizar. Las antraciclinas también son un ejemplo de citotoxina adecuada para uso con estos ligadores.

Otro ejemplo de una clase de ligadores sensibles al pH son los cis-aconitatos, que tienen un ácido carboxílico yuxapuesto a un enlace amida. El ácido carboxílico acelera la hidrólisis amida en los lisosomas aciditos. Ligadores que logran un tipo similar de aceleración de proporción de hidrólisis con varios otros tipos de estructura también se puede utilizar. Los maitansinoides son un ejemplo de un citotoxina que se puede conjugar con ligadores adheridos en el C-9.

Otros métodos de liberación potencial para conjugados de drogas es la hidrólisis enzimática de péptidos por enzimas lisosomales. En un ejemplo, un péptido se adhiere por vía de un enlace amida a alcohol para-aminobencilo y luego un carbamato o carbonato se hace entre el alcohol bencilico y el agente citotóxico. El clivaje del péptido conduce al colapso, o autoinmolación de carbamato aminobencilo o carbonato. Los agentes citotóxicos ejemplificados con esta estrategia incluyen antraciclinas, taxanos, mitomicina C, y auristatinas. En un ejemplo, un fenol también se puede generar por el colapso de ligador en cambio del carbamato. En otra variación, se utiliza la reducción de disulfuro para iniciar el colapso de un carbamato para-mercaptobencilo o carbonato.

Muchos agentes citotóxicos conjugados con anticuerpos tienen poca, si no ninguna solubilidad en agua y esta puede limitar la carga de logra en el conjugado debido a la agregación de conjugado. Una aproximación para superar esto es agregar grupos solubilizantes al ligador. Conjugados hechos con un ligador que consiste de PEG y un dipéptido se pueden utilizar, incluyendo aquellos que tienen un PEG di-ácido, tiol-ácido, ó maleimida-ácido adherido al anticuerpo, un espaciador dipéptido, y un enlace amida a la amina de una antraciclina ó un análogo duocarmicina. Otro ejemplo son los conjugados que se hacen con un disulfuro ligador que contiene PEG unido a un agente citotóxico y amida unida a un anticuerpo. Aproximaciones que incorporan grupos PEG pueden ser benéficos en superar la agregación y los límites en la carga de droga.

Ligadores representativos preferidos para la preparación de conjugados anticuerpo/droga de la invención. Incluyen ligadores de la fórmula:

$$(CO\text{-}Alc^1\text{-}Sp^1\text{-}Ar\text{-}Sp^2\text{-}Alc^2\text{-}C(Z^1)=Q\text{-}Sp)$$

en donde

Alc^1 y Alc^2 son independientemente un enlace o una cadena alquileno (C_1-C_{10}) ramificada o no ramificada;

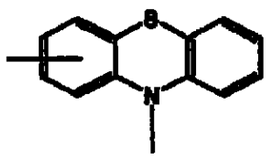
Sp^1 es un enlace, -S-, -O-, -CONH-, -NR'-, $-N(CH_2CH_2)_2N-$, ó -X-Ar'-Y-$(CH_2)_n$-Z en donde X, Y, y Z son independientemente un enlace, -NR'-, -S-, ó -O-, con la condición que cuando n=0, entonces al menos un Y y Z deben se un enlace y Ar' es 1,2-, 1,3-, ó 1,4 fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos ó tres grupos de alquilo (C_1-C_5), alcoxi (C_1-C_4), tioalcoxi (C_1-C_4),

alógeno, nitro, -COOR', -CONHR', $-(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, ó $-S(CH_2)_nCONHR'$, con la condición que cuando Alc^1 es un enlace, Sp^1 es un enlace;

N es un entero de 0 a 5;

R^1 es una cadena (C_1-C_5) ramificada ó no ramificada, opcionalmente sustituida por uno ó dos grupos de de -OH, alcoxi (C_1-C_4), tioalcoxi (C_1-C_4), alógeno, nitro, dialquilamino (C_1-C_3), ó trialquilamonio (C_1-C_3) $-A^-$ donde A^- en un anión farmacéuticamente aceptable que completa una sal;

Ar es 1,2-, 1,3-, ó 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos, ó tres grupos de alquilo de alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_5), tioalcoxi (C_1-C_4), alógeno, nitro, -COOR', -CONHR', $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, ó $-S(CH_2)_nCONHR'$, en donde n y R' son como se dfini aquí anteriormente o un 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2;3-, 2,6-, ó 2,7-naftilideno ó



con cada naftilideno ó fenotiazina opcionalmente sustituida con uno, dos, tres, ó cuatro grupos de alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_5), tioalcoxi (C_1-C_4), alógeno, nitro, -COOR', -CONHR', $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, ó $-S(CH_2)_nCONHR'$ en donde n y R' son como se definió anteriormente, con la condición que cuando Ar es fenotiazina, Sp^1 es un enlace sólo conectado al nitrógeno;

Sp^2 es un enlace, -S-, ó -O-, con la condición que cuando el Alc^2 es un enlace, Sp^2 es un enlace, Z^1 es H, alquilo (C_1-C_5), ó fenilo opcionalmente sustituido con uno, dos ó tres grupos de alquilo (C_1-C_5), alcoxi (C_1-C_5), tioalcoxi (C_1-C_4), alógeno, nitro, -COOR', -ONHR', $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, ó $-S(CH_2)_nCONHR'$ en donde n y R' son como se definió anteriormente;

Sp es un radical (C_1-C_{18}), divalente ó trivalente de cadena recta ó ramificada, radical arilo ó heteroarilo divalente o trivalente, radical heterociclo-alquilo ó cicloclquilo (C_3-C_{18}) divalente o trivalente, arilo divalente ó trivalente ó radical (C_1-C_{18}) hetero-arilo, radical (C_1-C_{18}) heterociclo-alquilo ó cicloalquilo divalente ó trivalente, ó radical alquilo no saturado (C_2-C_{18}) divalente ó trivalente, en donde el heteroarilo es preferiblemente furilo, tienilo, N-metilpirrolilo, piridinilo, N-metilimidazolilo, oxazolilo, pirimidinilo, quinolilo, isoquinolilo, N-metilcarbazoilo, aminocourmarinilo, ó fenazinilo y en donde si Sp es un radical trivalente, Sp se puede sustituir adicionalmente por dialquilamino (C_1-C_5) inferior, alcoxi (C_1-C_5) inferior, hidroxi, ó grupos alquiltio inferior (C_1-C_5)inferior; y

Q es =NHNCO-, =NHNCS-, =NHNCONH-, =NHNCSNH-, ó =NHO-. Preferiblemente, Alk^1 es una cadena alquileno (C_1-C_{10}) ramificada ó no ramificada; Sp' es un enlace, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, ó -NR' en donde R' es como se definió aquí anteriormenete, con la condición que cuando Alk^1 es un enlace, Sp^1 es un enlace;

Ar es 1,2-, 1,3-, ó 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos, ó tres grupos de alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_5),

tioacoxi (C_1-C_4), alógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O$(CH_2)_n$COOR', -S$(CH_2)_n$COOR', -O$(CH_2)_n$CONHR', ó -S$(CH_2)_n$CONHR' en donde n y R' son como se definió anteriormente, ó Ar es un 1,2-,1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6-, ó 2,7- naftilideno cada uno opcionalmente sustituido con uno, dos, tres, ó cuatro grupos de alquilo (C_1-C_6), alcoxi (C_1-C_5), tioalcoxi (C_1-C_4), alógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O$(CH_2)_n$COOR', -S$(CH_2)_n$COOR', -O$(CH_2)_n$CONHR', ó -S$(CH_2)_n$CONHR'.

Z^1 es alquilo (C_1-C_5), ó fenilo opcionalmente sustituido con uno, dos, ó tres grupos de alquilo (C_1-C_5), alcoxi (C_1-C_4), tioalcoxi (C_1-C_4), alógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O$(CH_2)_n$COOR', -S$(CH_2)_n$COOR', -O$(CH_2)_n$CONHR', ó -S$(CH_2)_n$CONHR'; Alk^2 y Sp^2 son ambos un enlace; y Sp y Q son como se definió aquí anteriormente.

La Patente estadounidense No. 5,773,001, incorporada aquí en su totalidad, describe ligadores que se pueden utilizar con drogas nucleofílicas, particularmente hidrazidas y nucleófilos relacionados, preparados a partir de las caliqueamicinas. Éstos ligadores son especialmente útiles en aquellos casos, en donde la mejor actividad se obtiene cuando el enlace formado entre la droga y el ligador es hidrolizable. Éstops ligadores contienen dos grupos funcionales, que incluyen (1) un grupo para reacción con un anticuerpo (por ejemplo, ácido carboxílico), y (2) un grupo carbonilo (por ejemplo, un aldehído ó una cetona) para reacción con una droga Los grupos carbonilo pueden reaccionar con un grupo hidrazida en la droga para formar un enlace hidrazona. Éste enlace es hidrolizable, permitiendo la liberación

del agente terapéutico del conjugado después de unirse a las células objetivo.

Como un ejemplo, un anticuerpo H8 humanizado ó quimérico, se puede conjugar con una droga citotóxica al (1) agregar al derivado de droga citotóxico al anticuerpo anti-5T4 en donde la droga citotóxica es 4.5 - 11% en peso de portador proteinaceo; (2) encubar el derivado de droga citotóxico y anticuerpo anti-5T4 en una solución amortiguada, compatible con proteína, no nucleofílica, que tiene un pH en el rango de aproximadamente 7 a 9 para producir un conjugado de droga/anticuerpo citotóxico monomérico, en donde la solución comprende adicionalmente (a) un cosolvente orgánico adecuado, y (b) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico C_6-C_{18} ó su sal, y en donde la incubación se conduce en una temperatura que varia de aproximadamente 30°C a cerca de 35°C durante un periodo de tiempo que varia de aproximadamente 15 minutos a 24 horas; y (3) someter el conjugado producido en la etapa (2) a un proceso de separación cromatográfico para separar conjugas monoméricos con una carga en el rango 3% a 10 % en peso de droga/citotóxica y con fracción conjugada baja (LCF) por debajo del 10% de anticuerpo no conjugado, derivado de droga citotóxico, y conjugados agregados.

La separación cromatográfica de la etapa (3) puede incluir procesos tales como cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), ultrafiltración/diafiltración HPLC, FPLC, ó cromatografía S-200 sefacril. La separación cromatográfica también se pude lograr mediante la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) utilizando medio cromatográfico de flujo rápido fenil Sefarosa 6,

medio cromatográfico de flujo rápido butil sefarosa 4, medio cromatográfico de flujo rápido octil sefarosa 4, medio cromatográfico toyopearl Éter-650M, medio HIC macro-prep metilo ó medio HIC macro-prep t-Butilo.

Métodos representativos para preparar conjugados de anticuerpo/droga anti-H8 incluyenaquellos descritos para la preparación del CMC-544 en las publicaciones de solicitud de Patente estadounidense publicadas co-pendientes No. 2004-082764A1 y la solicitud de Patente estadounidense No. 10/699,874, que se incorporan aquí en su totalidad. Se puede desarrollar la conjugación utilizando las siguientes condiciones: 10 mg/ml de anticuerpo, 8.5% (p/p) derivado de caliqueamicina, 37.5 mM decanoato de sodio, 9% (v/v) etanol, 50 mM HEPBS (N-(2-Hidroxyetil)piperazina-N'-(ácido 4-butanesulfónico)), pH 8.5, 32°C, 1 hora. La cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) se puede desarrollar utilizando una resina FF butil sefarosa, 0.65 M den amortiguador de carga de fosfato potasio, 0.49 M de amortiguador de lavado de fosfato potasio, y 4 mM de amortiguador de elusión de fosfato potasio. El intercambio de amortiguador se puede lograr por cromatografía de exclusión de tamaño, ultrafiltración/diafiltración, u otros medios adecuados. El conjugado de anticuerpo/droga se puede formular en 1.5% Dextran-40, 0.9% sucrosa, 0.01% TWEEN®-80, 20 mM Tris/50 mM NaCl, pH 8.0. Una solución de formulación alterna que contiene 5% de sacarosa, 0.01% de TWEEN®-80, 20 mM Tris/10 mM NaCI, pH 8.0 tambie´n se puede utilizar. Los ciclos de liofilización se ajustan basados en la formulación .La concentración de la masa formulada puede ser 0.5 mg : conjugado/ml. Cada frasco puede contener 1 mg de

conjugado, es decir, 2 ml de lleno. Otros volúmenes de llenado pueden ser preparados según se desee,, por ejemplo, 5 ml de lleno.

Otros métodos representativos incluyen aquellos descritos para el CMD-193, también descrito en la solicitud de Patente estadounidense co-pendiente No. 11/080,587. La conjugaciones puede desarrollar utilizando las seiguientes condiciones: anticuerpo 10 mg/ml, derivado de caliqueamicina 7% (p/p), 10 mM de deoxicolato, 50 mM HEPBS (N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 4-butanosulfónico)), 9% (v/v) etanol, pH 8.2, 32°C, 1 hora. La reacción se puede diluir con 10 vesces con 0.66 M de fosfato de potasio pH 8.56, y el HIC se puede desarrollar utilizando una resina FF butil cefarosa 0.60 M, amortiguador de carga fosfato potasio, y amortiguador de lavado, y 20 mM Tris/25 mM NaCl amortiguador de elusión. El intercambio de amortiguador se puede lograr utilizando ultrafiltración/diafiltración con una membrana de celulosa regenerada. El conjugado se puede diafiltrar contra 20 mM Tris/10 mM NaCl pH 8.0 (10 diavolúmes). El conjugado anticuerpo/droga se puede formular en 5% de sacarosa, 0.01% TWEEN®-80, 20 mM Tris/10 mM NaCl, pH 8.0. La concentración del conjugado de masa después de la conjugación puede ser 1 mg/ml, y el frasco lleno puede ser de 5 mg/vial, es decir, 5 ml de lleno, u otros volúmenes de llenado se pueden prepara según se desee.

En una modalidad particular de la invención, el ligador empleado es ácido 4-(4- acetilfenoxi) butanóico (AcBut). Los conjugados anticuerpo/droga se preparan al hacer reaccionar β-caliqueamicina, γ-caliqueamicina ó N-acetil γ-caliqueamicina, ó

derivados de éstos, con 3-mercapto-3-metil butanoil hidrazida, el ligador AcBut, y un anticuerpo anti-5T4 de la invención. Ver, por ejemplo, Patente estadounidense No. 5,773,001. éste ligador produce conjugados que son sustancialmente estables en circulación, que liberan un estimado del 2% de DMH NAc-gamma por día, y que liberan el DMH NAc-gamma fácilmente en lisosomas acídicos. En otras modalidades de la invención, se preparan aconjugados anticuerpo/droga que utilizan ácido 3-acetilfenil acídico (AcPac) ó ácido 4-mercapto-4-metil-pentanóico (Amida) como la molécula ligadora.Ver ejemplo 2.

Ligadores representativos útiles para conjugación de radioisótopos incluyen dietilenetriamina pentaacetato (DTPA)-isotiocianato, clorhidrato de 6-hidrazinio nicotinato succinimidilo (SHNH), y osima amina hexametilpropileno (HMPAO) (Bakker et al. (1990) J. Nucl. Med. 31: 1501-9, Chattopadhyay et al. (2001) Nucl. Med. Biol. 28: 741- 4, Dewanjee et al. (1994) J. Nucl. Med. 35: 1054-63, Krenning et al. (1989) Lancet 1 : 242-4, Sagiuchi et al. (2001) Ann. Nucl. Med. 15: 267-70); U.S. Patent No. 6,024,938). Alternativamente, una molécula objetivo se puede derivar de tal forma que el radioisótopo de puede unir directamente a éste. (Yoo et al. (1997) J. Nucl. Med. 38: 294-300). Los métodos de yodinación también se conocen en la técnica, y se pueden encontrar protocolos representativos, por ejemplo, en Krenning et al. (1989) Lancet 1:242-4 y en Bakker et al. (1990) J. Nucl. Med. 31:1501 -9. Par incrementar adicionalmente el número de moléculas de droga por conjugado de anticuerpo/droga, la droga se puede conjugar a polietilen glicol (PEG), que incluye polímeros y monómeros de polietileno recto o ramificados. Un

monómero PEG es de la fórmula: $-(CH_2CH_2O)-$. Las drogas y/o análogos de péptidos pueden enligarse al PEG directamente o indirectamente, es decir, mediante grupos espaciadores apropiados, tales como azúcares. Una composición PEG/anticuerpo/droga, puede también incluir partes lipofílicas y/o hidrofílicas adiciones para facilitar la estabilidad de la droga, y el suministro a un sitio objetivo in vivo. Los métodos representativos para preparar composiciones que contiene PEG pueden encontrarse en las patentes estadounidenses Nos. 6,461,603; 6,309,633; y 5,648,095, entre otros lugares.

La naturaleza hidrofóbica de muchas drogas, incluyendo las caliqueamicinas, puede resultar en la agregación de los conjugados de anticuerpo/droga. Para producir conjugados monoméricos de anticuerpo/droga con carga/producción de droga mayor y agregación disminuida, la reacción de conjugación debe ser llevada a cabo en una solución no nucleofílica, compatible a proteína, amortiguada (i) propilenglicol como un codisolvente, y (ii) un aditivo que comprende por lo menos un ácido carboxílico con 6 a 18 carbonos (C_6-C_{18}). Ácidos útiles incluyen los ácidos con 7 a 12 carbonos (C_7 a C_{12}), tales como el ácido octanóico ó el ácido caprílico, ó fusales. Otros codisolventes orgánicos compatibles con proteínas diferentes del propilenglicol, tal como el etilenglicol, el etanol, el DMF, el DMSO, etc, puede también ser usados. Algo ó todo del codisolvente orgánico es usado para transferir la droga en la mezcla de conjugación. Amortiguadores útiles para la preparación de los conjugados anticuerpo/droga usan ésteres de N-hidroxisuccinimida (OSu)u otros ésteres comparablemente activados que incluyen salina amortiguada con

fosfato (PBS)y ácido N-2-hidroxietil piperacina-N`-2-etanosulfónico (amortiguador HEPES). La solución amortiguada usada en las reacciones de conjugación debería carecer substancialmente de aminas libres y de nucleófilos. En otro modelo, las reacciones de conjugación pueden llevarse a cabo en una solución no nucleofílica, compatible con proteína, amortiguada que contiene t-butanol sin aditivos adicionales. Ver, por ejemplo las patentes estadounidenses Nos. 5,712,374 y 5,714,586. Métodos adicionales para la conjugación y conjugados que contienen caliqueamicina se describen en las patentes estadounidenses Nos. 5,739,116 y 5,877,296.

Las condiciones de reacción óptimas para la formación de un conjugado monomérico pueden ser determinadas científicamente mediante la variación de las variables de la reacción, tales como temperatura, pH, entrada del derivado de caliqueamicina, y la concentración de aditivo. Cantidades representativas de polietilenglicol varían entre 10% a 60%, por ejemplo 10% a 40%, ó cerca de 30% en volumen de la solución total. Las cantidades representativas de un aditivo que comprenden por lo menos un ácido carboxílico con C_6 a C_{18} ó sus sales varían entre 20 mM a 100 mM, tal como desde 40 mM a 90 mM, ó cerca de 60 mM a 90 mM. La concentración del ácido carboxílico con C_6 a C_{18} ó sus sales pueden incrementarse a 150 hasta 300 mM, y el codicolvente caer de 1% hasta 10%. En modalidades representativas de la invención, el ácido carboxílico es ácido octanóico, ácido decanóico, ó sus sales correspondientes. Por ejemplo, 200 mM de ácido caprílico pueden ser usados con 5% de propilenglicol o etanol. La reacción de conjugación puede llevarse a cabo a temperaturas ligeramente

elevadas (30 a 35°c) y pH (8.2-8.7). La concentración del anticuerpo puede variar entre 1 a 15 mg/ml y la concentración de un derivado de caliqueamicina, por ejemplo, éster de gamma-caliqueamicina DMH AcBut OSu de N-Acetilo, puede variar entre cerca de 4.5% a 11% peso del anticuerpo. Las condiciones adecuadas para la conjugación de otras drogas pueden ser determinada por aquellos expertos en la técnica sin experimentación indebida.

II.C. Purificación de Conjugados de Anticuerpo/Droga

Luego de la conjugación, los conjugaos monoméricos pueden ser separados a partir de reactivos no conjugados y/o formas agregadas de los conjugados mediante métodos convencionales, por ejemplo cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), cromatografía por interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), ó cromatoenfocamiento (CF). Los conjugados purificados, son monoméricos, y usualmente contienen entre 3% a 10% de droga en peso. Los conjugados anticuerpo/droga también pueden ser purificados usando la cromatografía por interacción hidrofóbica (HIC), que ofrece algunas ventajas sobre la SEC incluyendo (1) una capacidad para reducir eficientemente el contenido de LCF lo mismo que del agregado; (2) la acomodación de grandes volúmenes de reacción; y (3) dilución mínima del producto. El medio de HIC de alta capacidad adecuado para la producción a escala incluyen un medio de flujo rápido cromatográfico de Fenil separosa 6, medio cromatográfico de flujo rápido de Butil Separosa 4, medio cromatográfico de flujo rápido de Octil Separosa 4, medio cromatográfico de Toyopearl éter-650M,

medio cromatográfico HIC Macro-Prep metilo ó medio HIC Macro-Prep t-Butilo. La ultrafiltración/diafiltración también pueden ser usados para el intercambio de amortiguador.

En un proceso de purificación representativo, se llevan a cabo múltiples etapas, incluyendo una etapa de remoción de células por centrífuga, una etapa de captura de afinidad de la proteína A, seguido por una o dos etapas de pulido cromatográfico ortogonal, una etapa de filtración de virus, y una etapa de flujo tangencial para la concentración y la formulación. El proceso de purificación preferiblemente produce producto con menos de 5% de agregado, menos de 20 ppm de proteína A, menos del 50ppm de proteína de células anfitriona, y una recuperación general mayor al 50%.

Un preparación típica humanizada deanti-5T4/caliqueamicina, contiene predominantemente (aproximadamente 95%) de anticuerpo conjugado que contiene 5 a 7 moles de caliqueamicina por mol de anticuerpo. El conjugado ha sido preparado de manera reproducible a escala de laboratorio (10-200 mg). La carga de la droga, es expresada como µg de caliqueamicina/mg mAb, es determinada dividiendo la concentración de caliqueamicina (µg/mL) por la concentración de anticuerpo (mg/mL). Éstos valores son determinados mediante medir la absorbancia UV de la solución conjugada a 280nm y 310nm. Es importante notar que ésta es una carga promedio, y que la carga real es una distribución quasi-gaussiana centrada en el valor de carga promedio, es decir, algo del anticuerpo es cargado mayor que el promedio, y algo de el anticuerpo es cargado menor que el promedio. El anticuerpo no

conjugado (fracción conjugada baja) que puede ser medida usando HIC-HPLC analítico (cromatografía liquida de alto desempeño con interacción hidrofóbica), es la población de anticuerpo que tiene poco o ninguna caliqueamicina conjugada. Éste valor es una medida de la distribución de caliqueamicina en el anticuerpo y generalmente no afecta la cantidad de caliqueamicina dosificada. La caliqueamicina no conjugada, que puede medida usando ELISA, se refiere a la cantidad de caliqueamicina que no está conjugada al anticuerpo y es expresada en términos de porcentaje del total de caliqueamicina. Los ensayos de carga de droga no diferencian entre caliqueamicina no conjugada y conjugada. La cantidad de caliqueamicina no conjugada no es detectable o despreciable cuando se usan ensayos de carga de droga, y por lo tanto éstos ensayos miden efectivamente la cantidad de caliqueamicina conjugada.

Los métodos analíticos pueden ser usados para ensayar la liberación y el estado de estabilidad de los conjugados humanizados de anti-5T4 caliqueamicina. Los conjugados pueden ser evaludos en cuanto a identidad (IEF), fuerza (proteína total y carga de caliqueamicina total), pureza (caliqueamicina no conjugada, anticuerpo conjugado bajo, contenido de agregado y SDS-PAGE reducido), e immunoafinidad (ELISA para ligado de antígeno). Los ensayos adicionales conocidos por aquellos versados en la técnica pueden ser usados. Usar éstos ensayos, se puede mantener la consistencia tanda a tanda en la fabricación comercial.

II.D. Farmacocinética de los conjugados de anticuerpo/droga

La farmacocinética de los inmunoconjugados objetivados a 5T4- pueden ser evaluados y comparada con la farmacocinética de caliqueamicina no conjugada en diversos animales. Por ejemplo, esto puede hacerse siguiendo una administración de un bolo intravenoso único, en ratones desnudos hembra, ratas Sprague-Dawley macho, y micos cinomolgus hembra. La farmacocinética de un anticuerpo anti-5T4 se caracteriza generalmente por baja clarisas, bajo volumen de distribución, y vida promedio terminal aparentemente larga en diversas especies. Las concentraciones de sueros de derivados de caliqueamicina no conjugadas, se espera que estén por debajo de el límite de cuantificación. El perfil de toxicidad para éstos conjugados en los estudios de rango de toxicidad de dosis única, se espera que sea similar a aquellos obtenidos para otros conjugados de anticuerpo/caliqueamicina en dosis comparables.

III. Usos de anticuerpos anti-5T4 y conjugados de anticuerpo/droga quiméricos y humanizados.

Los anticuerpos humanizados anti-5T4 y los conjugados de anticuerpo/droga de la invención, son útiles tanto en aplicaciones in vitro e in vivo, relacionadas con células que expresan el 5T4. Como se describió en el ehemplo 1, las células de cáncer que expresan 5T4 incluyen carcinoma de pulmón escamoso/adenomatoso (carcinoma de pulmón de células no péquelas), carcimona de pecho invasivo, carcinoma colorectal,

carcinoma gástrico, carcinoma servical escamoso, adenocarcinoma endometrial invasivo, carcinoma del páncreas invasivo, carcinoma de los ovarios, carcinoma vesical escamoso, y coriocarcinoma. El 5T4 fue detectado en altos niveles en carcinomas de los bronquios, pecho, colon, recto, estómago, la cervix, endometrio, páncreas, ovarios, corio, y vesículas seminales.

Para aplicaciones in vivo, la utilidad de los anticuerpos humanizados descritos como vehículos para drogas, recae en su habilidad para comportarse como moléculas objetivo. El término objetivo, se refiere al movimiento preferencial y/o la acumulación de un péptido o un análogo de péptido en un tejido objetivo, en comparación a un tejido de control. El término tejido objetivo es usado aquí para referirse a tejidos que comprenden células que expresan 5T4, es decir, un sitio propuesto para la acumulación de un conjugado de anticuerpo/droga de la invención, luego de la administración a un sujeto. El término tejido de control, como se usa aquí, se refiere a un sitio que se sospecha que carece substancialmente de ligado y/o acumulación de un conjugado de anticuerpo/droga administrado, es decir, tejidos que substancialmente carecen de células que expresan de 5T4. El término objetivo selectivo, es usado aquí para referirse a una localización preferencial, de un conjugado anticuerpo/droga tal que una cantidad de conjugado de anticuerpo/droga en un tejido objetivo es de cerca de 2 veces mayor que una cantidad de análogo de péptido en un tejido de control, de modo que una cantidad que es de 5 veces o mayor, a cerca de 10 veces o mayor.

III.A. Aplicaciones In Vitro

La presente invención suministra métodos in vitro que usan anticuerpos anti-5T4 humanizados. Por ejemplo, los anticuerpos descritos pueden ser usados sólos o en combinación con agentes citotóxicos u otras drogas para ligar específicamente células de cáncer que son positivas 5T4 para vaciar tales células desde una muestra celular.

Los métodos también son provistos para la histolisis objetivada mediante poner en contacto células que expresan el 5T4 con un conjugado anticuerpo/droga que comprende un anticuerpo anti-5T4 conjugado con una citotoxina. Ver los ejemplos 3 y 8. También se han suministrados métodos para inhibir la proliferación de células uq expresan 5T4 y para inducir la apoptosis de células que expresan 5T4 mediante ponerlas en contacto, con un conjugado de anticuerpo/droga que comprende una droga citotóxica. El poner en contacto las células que expresan el 5T4 con el conjugado de anticuerpo/droga puede llevarse a cabo in vitro o in vivo.

III.B. Métodos de Diagnóstico y Detección

Los anticuerpos anti-5T4 humanizados de la invención también tienen utilidad en la detección de células de 5T4+ in vitro e in vivo, con base en la habilidad para ligarse específicamente al antígeno 5T4. Un métodod para detectar células uq expresan 5T4 pueden comprender: (a) preparar una muestra biológica que comprende células; (b) poner en contacto un anticuerpo anti-5T4 humanizxaco con la muestra biológica in vitro, en dond el

anticuerpo comprende un marcador detectable; y (c) detectar la marca detectable cuando las células que expresan el 5T4 son detectas.

Los métodos de detección descritos, también pueden llevarse a cabo in vivo, por ejemplo, como útiles para diagnóstico, para suministrar asistencia o ayuda intreoperativa, ó para la determinación de la dosis. Luego de la administración de un anticuerpo anti-5T4 humanizado marecado a un sujeto, y después de un tiempo duficiente a lograr el ligado, la biodistribución de las células expresan 5T4 ligadas por anticuerpo pueden ser visualizadas. Los métodos de diagnóstico descritos pueden ser usados en combinación con métodos de tratamiento. En adición los anticuerpos anti-5T4 humanizados de la invención, pueden ser administrados para el propósito dual de detección y terapia.

Los métodos de detección no invasivos representativos incluyen la cintigrafía (por ejemplo, SPECT (Tomografía computarizada por emisión de fotón único), PET (Tomografía por emisión por emisión de Positrón), imágenes de cámara gamma, y escaneo ó barrido rectilíneo), imágenes por resonancia magnética (por ejemplo, imágenes por resonancia magnética de convención, imágenes de transferencia de magnetización (MTI), espectroscopia por resonancia magnética del protón (MRS), imágenes pesadas por difusión (DWI) e imágenes MR funcionales (fMRI)), y ultrasonido.

III.C. Aplicaciones Terapéuticas

La presente invención se relaciona adicionalmente con métodos y composiciones útiles para inducir la histolisis de células de cáncer que expresan 5T4 en un sujeto. Así, los métodos descritos, son útiles para inhibir el crecimiento del cáncer, incluyendo el crecimiento de tumor retardado y la inhibición de la metastasis. Aunque no se ha propuesto esta amarrado por ningún mdo de operación único, tanto la objetivación guiada por antígeno (ver, por ejemplo, ejemplos 3, 4, y 9), lo mismo que la objetivación pasiva (ver, por ejemplo, ejemplo 10) de conjugados de H8-caliqueamicina humanizados puede contribuir a la eficacia anti-tumor.

Los cánceres representativos tratables usando los anticuerpos anti-5T4 descritos y los conjugados anticuerpo/droga incluyen tumores primarios que expresan 5T4 y metastáticos en pecho, colon, recto, pulmón, orofaringe, hipofaringe, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula bilial, ductos de la bilis, intestino pequeño, tracto urinario incluyendo riñón, vejiga y urotelio, tracto genital hembra, cervix, útero, ovarios, tracto genital macho, próstata, vesículas seminales, testiculos, una glándula endocrina, glándula tiroide, glándula adrenal, glándula pituitaria, piel, hueso, tejidos blancos, vasos sanguíneo, cerebro, nervios, ojos, meninges. En particular, los conjugados de anticuerpo anti-5T4/droga descritos de la invención pueden ser usados para el tratamiento de cánceres de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pecho metastático, cáncer pancreático, lo mismo que monoterapias de segunda línea, y como parte de terapias

de combinación de segunda línea. Los cánceres objetivos también pueden expresar el antígeno de carbohidrato Lewis Y, incluyendo pecho, colon, gástrico, esofagio, pancreático, duodenal, pulmón, vejiga, y carcinomas renales y gástricos y tumores neuroendocrinos de célula islet. Ver patente estadounidense No. 6,310,185.

Los métodos descritos también pertenecen a la leucemia que expresa el 5T4 y células de linfoma, incluyendo las células de linfoma Hodgkin y las células de linfoma no Hodgkin. Las células de linfoma, pueden ser células de linfoma indolentes, agresivas, de bajo grado, de grado intermedio, ó de alto grado.

Así, los pacientes que van a ser tratados con conjugados anti-5T4 de anticuerpo/caliqueamicina de la invención, pueden ser seleccionados con base en la expresión de biomarcadores, incluyendo, pero sin limitarse, a la expresión elevada del antígeno 5T4, resultando en una población de pacientes seleccionados para enriquecer la expresión objetivo en vez de el origen del tumor ó la histología. La expresión objetivo, también puede ser medida como una función del número de células manchadas combinadas con la intensidad de las células manchadas. Por ejemplo, la clasificación de alta expresión de 5T4 incluye aquellos pacientes compás de 30% (es decir 40%, 50%, ó 60%), de las células ensayadas por manchado positivo inmunohistoquímico para 5T4 en un nivel de 3+ (sobre una escala de 1 a 4), mientras que la expresión moderada de 5T4 puede incluir aquellos pacientes con más de 20% de las células manchadas en 1+ a 2+.

Los biomarcadores diferentes a la expresión del antígeno 5T4 pueden también ser usados para la selección de pacientes, incluyendo la caracterización del tumor con base en la resistencia a las multidrogas (MDR), por ejemplo. Carce de 50% de cpanceres humanos, son completamente resistentes a la quimioterapia, o responden solamente transitorio, después de lo cual ellos no son afectados por las drogas anticáncer comúnmente usadas. Éste fenómeno se ha llamado MDR y es expresado inherentemente por algunos tipos de tumor, mientras que otros adquieren MDR, después de lo exposición al tratamiento con quimioterapia. La droga de bombeo de flujo de P-glicoproteína media una mayoría del MDR asociado con quimioterapéuticos citotóxicos. El análisis fenotípico y funcional de los mecanismos del MDR, presentan en pacientes de cáncer, especimenes de tumor, que pueden ser conducidos para poder relacionarse con mecanismos MDR específicos, con resistencia a la quimioterapia en tipos de tumor específicos.

El término de cáncer, como se usa aquí, también involucra los desórdenes proliferativos no neoplásticos. Así, los métodos de la presente invención están contemplados para el tratamiento o prevención de hiperplasia, metaplasia, y más particularmente, la displasia (para una revisión de tales cndiciones de crecimiento normal, ver DeVita, Jr.et a. (2001), Cancer: Principles and Practice. Edición 6ª, Lippincott Williams & Wilkins.

El termino crecimiento de cáncer, generalmente se refiere a cualquiera de un numero de índices que sugieren cambios dentro del cáncer a una forma de desarrollo mayor. S[i, los índices para medir una inhibición del crecimiento del cáncer, incluyen pero n se limitan, a una disminución en la supervivencia de células cancerosas, una disminución en el volumen del tumor o de la morfología (por ejemplo, según se determinó usando la tomografía computarizada (CT), la sonografía, u otros métodos para producir imágenes), un crecimiento de tumor retardado, una destrucción de la vasculatura del tumor, un desempeño mejorado en el ensayo de hipersensibilidad retardada de la piel, un incremento en la actividad de T-linfocitos citolíticos, y una disminución en los niveles de antígenos específicos a tumor. El término crecimiento de tumor retardado se refiere a una disminución en la duración del tiempo requerisa para que uin tumor crezca hasta una cantidad especificada. Por ejemplo, el tratamiento puede retardar el tiempo requerido para que un tumor se incremente en volumen tres veces con relación a un día inicial de medida (día 0), ó el tiempo requerido para crecer hasta $1cm^3$.

III.D. Formulación

Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados de la invención, son preparados fácilmente y formulados en cuanto al uso clínico seguro y eficaz. Las formulaciones adecuadas para administración a un sujeto incluyen soluciones de inyección estéril acuosa y no acuosas que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos, antibacterianos, y agentes antihongos (por ejemplo, parabenes, clorobutanol, fenol, ácido

ascórbico, y timerosal), solutos que convierten la solución en isotónica con los fluidos del cuerpo del receptor propuesto (por ejemplo, azúcares, sales, y polialcoholes), agentes de suspensión y agentes espesantes. Los disolventes adecuados incluyen agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol y polietilen glicol líquido), y mezclas de ellos. Las formulaciones pueden ser presentadas en dosis unitarias o en contenedores multi-dosis, por ejemplo, ampoyas y rrascossellados, y pueden ser almacenados en condición congelada, ó secados por congelamiento (liofilizado), que requieren solamente la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes del uso para su administración a un sujeto, o para la radiomarcación subsiguiente con un isótopo apropiado para la aplicación propuesta. Los anticuerpos Anti-5T4 y lkos conjugados de anticuerpo/droga de la invención son preferiblemente en una dosis efectiva, descrita más adelante.

Como un ejemplo, una formulación de anticuerpo anti-5T4 representativa comprende una formulación multi-dosis de 40 mg/ml ó de conjugado anticuerpo/droga, 25 mM de acetato, 150 mM trealosa, 0.9% de alcohol de bencilo, 0.02% de polisorbato 20 at pH 5.0, y que tiene una vida de estantería mínima de dos años de almacenamiento entre 2 a 8°C. Como otro ejemplo, la formulación de anticuerpo anti-5T4 puede comprender 10 mg/ml de anticuerp ó de conjugado de anticuerpo/droga en 9.0 mg/ml de cloruro de sodio, 7.35 mg/ml de dihidrato de citrato de sodio, 0.7 mg/ml de polisorbato 80, y agua estéril, pH 6.5. Formulaciones representativas de conjugado de anti-5T4/caliqueamicina para administración para modelos de ratones experimentales incluyen 2

µg ó 4 µg de caliqueamicina (ver, Ejemplos 3, 4, y 7), que puede ser escalados de acuerdo a lo anterior para la administración a humanos.

Una formulación liofilizada estable de un anticuerpo anti-5T4 ó de un conjugado de anticuerpo/droga puede ser preparado por (a) disolver un conjugado de anticuerpo/droga hasta una concentración final de 0.5 a 2 mg/ml en una solución que comprende un crioprotector en una concentración de 1.5%-5% en peso, un agente de relleno polimérico a una concentración de 0.5-1.5% en peso, electrolitos a una concentración de 0.01 M a 0.1 M, un agente facilitador de la solubilidad a una concentración de 0.005% a 0.05% en peso, un agente amortiguador en una concentración de 5-50 mM, de modo que el pH final de la solución esté entre 7.8-8.2, y agua; (b) dispersar la solución anterior en frascos a una temperatura de +5°C a +10°C; (c) congelar la solución a una temperatura de congelamiento de -35°C a -50°C; (d) someter la solución congelada a una etapa de secado por congelamiento inicial a una presión de secado primaria de 20 a 80 micrones a una temperatura de instante de -10°C a -40°C durante 24 a 78 horas; y (e) someter el producto secado por congelamiento de la etapa (d) a una segunda etapa de secado a una presión de secado entre 20 a 80 micrones a una temperatura de instante de +10°C hasta +35°C durante 15 a 30 horas.

Los crioprotectores representativos útiles para la liofilización del crioprotector incluye alditol, manitol, sorbitol, inositol, polietilen glicol, ácido aldónico, ácido urónico, ácido aldárico, aldosas, cetosas, azúcares amino, alditoles, inositoles,

gjiceraldehído, arabinosa, lixosa, pentosa, ribosa, xilosa, galactosa, glucosa, hexosa, idosa, manosa, talosa, heptosa, glucosa, fructosa, ácido glucónico, sorbitol, lactosa, manitol, α-glucopiranosida de metilo, maltosa, ácido isoascórbico, ácido ascórbico, lactona, sorbosae, ácido glucárico, eritrosa, treosa, arabinosa, alosa, altrosa, gulosa, idosa, talosa, eritrulosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, tagatosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido manurónico, glucosamina, galactosamina, sucrosa, trealosa, ácido neuramínico, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos, levan, fucoidano, carragenano, galactocarolosa, pectinas, ácido péctico, amilosa, pululano, glycogeno, amilopectino, celulosa, dextrano, pustulano, chitina, agarosa, queratina, chondroitina, dermatano, ácido hialurónico, ácido algínico, goma de xantano, almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, trealosa, etilen glicol, polietilen glicol, polipropilen glicol, glicerol y pentaeritritol.

Por ejemplo, el crioprotector de sacarosa puede ser usado en una concentración de 1.5% en peso, el agente de relleno polimérico Dextran 40 ó el almidón hidroxietilo 40 pueden ser usados a una concentración de 0.9% en peso, el electrolito usado en la solución de liofilización es cloruro de sodio, que está presente en una concentración de 0.05 M, y el agente de amortiguación trometamina puede ser usado en una concentración de 0.02 M. Un agente facilitador de la solubilidad (un tensoactivo tal como el Polisorbato 80) puede ser usado durante el proceso de liofilización. Usualmente éste agente facilitador de la solubilidad es un tensoactivo. Las etapas representativas para la

preparación de una formulación liofilizada incluyen congelar los frascos a una temperatura de -45°C; la solución congelada es sometida a una etapa de secado por congelamiento inicial, a una presión de secado primaria de 60 micrones a una temperatura de estante de -30°C durante 60 horas; y someter el producto secado por congelamiento a una segunda etapa de congelamiento a una presión de secado de 60 micrones a una temperatura de estante de +25°C durante 24 horas.

Los anticuerpos Anti-5T4 y los conjugados de anticuerpo/droga son formulados en un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, macromoléculas metabolizadas lentamente grandes tales como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacaridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, ácidos de amino poliméricos, y copolímeros de ácidos amino, y partículas de virus inactivas. Las sales farmacéuticamente aceptables, también pueden ser usadas, por ejemplo, sales de ácido minerales, tales como hidrocloruros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, ó sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos. Las formulaciones pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, salina, glicerol, y etanol, y/o substancias auxiliares, tales como agentes humectantes ó emulsificantes ó substancias amortiguadoras del pH, pueden estar presentes en tales composiciones. Tales vehículos permiten a las composiciones ser formuladas como tabletas, píldoras, grajeas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas y suspensiones, para ingestión por el paciente.

III E. Dosificación y administración

Un anticuerpo anti-5T4 humanizado puede ser administrado parenteralmente, por ejemplo, vía intravascular, subcutánea, intraperitoneal, o por administración intramuscular. Para el suministro de las composiciones a las vías respiratorias, las composiciones pueden ser administradas como un aerosol o un roseado basto, es decir, administración transnasal. La administración Intratecal ó intramedular puede ser utilizada para el tratamiento del sistema nervioso central (CNS) y de los cánceres relacionados con el CNS. Un anticuerpo 5T4 de la invención, puede también ser administrado transdérmicamente, transcutáneamente, tópicamente, entericamente, intravaginalmente, sublingual o rectalmente. Un método de suministro es seleccionado con base en las consideraciones tales como la condición y el sitio a ser tratado, el tipo de formulación de anticuerpo, y la eficacia terapéutica de la composición. La administración intravenosa puede ser utilizada rutinariamente en la clínica.

La presente invención suministra que una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-5T4 humanizado es administrada a un sujeto. El término cantidad efectiva, es usado aquí para describir una cantidad de un anticuerpo anti-5T4 humanizado suficiente para producir una respuesta biológica deseada. Por ejemplo, cuando es administrado a un sujeto que tiene cáncer, una cantidad efectiva comprende una cantidad suficiente para producir una actividad anticáncer, incluyendo citólisis de células de cáncer, inhibición de proliferación de células cancerosas, inducción de apoptósis de célula de cáncer, reducción de los antígenos de células de

cáncer, retardamiento del crecimiento de tumor, e inhibición de la metástasis. Un encogimiento de tumor es bien aceptado como un marcador surrogado clínico para eficacia. Otro marcador bien aceptado para la eficacia es la supervivencia de libre de la progresión. Los conjugados de Anti-5T4/caliqueamicina demuestran generalmente por lo menos un 25% de mejoramiento, en los parámetros clave de eficacia, tales como un mejoramiento en la sobrevivencia media, tiempo para la progresión del tumor, y velocidad de la respuesta general.

Generalmente, una dosis efectiva está en el rango de entre cerca de 0.01 mg/m^2 hasta cerca de 50 mg/m^2, tal como desde de cerca de 0.1 mg/m^2 hasta cerca de 20 mg/m^2, o desde cerca de 15 mg/m^2, dicha dosis es calculada con base en la cantidad de anticuerpo anti-5T4 ó con base en la cantidad de caliqueamicina en la preparación de anticuerpo/caliqueamicina. Las dosis representativas de un conjugado anti-5T4/caliquamicina para la administración a modelos de ratón experimentales incluyen de 2 µg ó de 4µg de caliqueamicina (ver los ejemplos 3-4 y 9), que puede ser escalada de acuerdo a lo anterior para la administración a humanos. Por ejemplo, los conjugados anti-5T4/caliqueamicina de la invención se pueden administrados a pacientes humanos, una vez cada 3 semanas, hasta 6 ciclos. Para un anticuerpo anti-5T4 radiomarcado, una dosis efectiva está típicamente en el rango entre cerca 1 mCi hasta cerca de 300 mCi, normalmente cerca de 5 mCi a 100 mCi, dependiendo del radioisótopo y de la afinidad de ligado del anticuerpo.

Para la detección de células positivas de 5T4 que usan los anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados, una cantidad detectable de una composición de la invención es administrada a un sujeto. Una cantidad detectable, como se usa aquí para referirse a una composición de diagnóstico, se refiere a una dosis de anticuerpo H8 quimérico o humanizado, de modo que la presencia del anticuerpo puede ser determinada in vitro o in vivo. Para la producción de imágenes cintigráficas usando radioisótopos, las dosis típicas de un radioisótopo pueden incluir una actividad del cerca de 10 µCi a 50 mCi, ó cerca de 100 µCi a 25 mCi, ó cerca de 500 µCi a 20 mCi, ó cerca 1 mCi a 10 mCi, ó cerca de 10 mCi.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en una composición de la invención, pueden ser variados de modo que se administre una cantidad de la composición que sea efectiva para lograr el diagnóstico ó el resultado terapéutico deseados. Los regímenes de administración también pueden ser variados. Una inyección única, ó inyecciones múltiples pueden ser usadas. El nivel de dosificación seleccionado, y el régimen seleccionado dependerán de una variedad de una variedad de factores incluyendo la actividad y la estabilidad (es decir, vida promedio), de la composición terapéutica, la formulación, la vía de administración, la combinación con otras drogas o tratamientos, la enfermedad ó desorden a ser detectado y/o tratado, y la condición física e historia médica previa del sujeto que va a ser tratado.

Para cualquier anti-5T4 ó conjugado de anticuerpo/droga de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva, puede ser estimada inicialmente sea en ensayos de cultivos celulares o en modelos de animales, usualmente roedores, conejos, perros, marranos, y/o primates. El modelo de animal puede también ser usado para determinar el rango de concentración apropiado y la vía de administración. Tal información, puede entonces ser usada para determinar dosis útiles y vías para la administración en humanos. Típicamente una dosis mínima es administrada, y la dosis es escalada en la ausencia de citotoxicidad limitante de la dosis. La determinación y el ajuste de una cantidad efectiva o dosis, lo mismo que la evaluación de cuando y como hacer tales ajustes, son conocidos por aquellos generalmente versados en la técnica de la medicina.

Para guía adicional con respecto a la formulación, dosis, régimen de administración, y resultados terapéuticos medibles, ver Berkow et al. (2000) The Merck Manual of Medical Information. Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, New Jersey; Ebadi (1998) CRC Desk Reference of Clinical Pharmacology. CRC Press, Boca Raton, Florida; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania; Katzung (2001) Basic & Clinical Pharmacology. Lange Medical Books / McGraw-Hill Medical Pub. Div., New York; Hardman et al. (2001) Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. The McGraw-Hill Companies, Columbus, Ohio; Speight & Holford (1997) Avery's Drug Treatment: A Guide to the Properties. Choices. Therapeutic Use and Economic Value of Drugs

in Disease Management. Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania.

III.F. Terapias de combinación

Los anticuerpos anti-5T4 descritos, puede ser administrados como un tratamiento inicial, ó para el tratamiento de condiciones que no tienen respuesta a terapias convencionales. En adición, los anticuerpos anti-5T4 descritos, pueden ser usados en combinación con otras terapias, (por ejemplo, excisión quirúrugica, radiación, drogas adicionales objetivadas para anti-cáncer ó drogas sistémicas anti-cáncer, etc.), para así producir efectos terapéuticos aditivos o potenciados y/o reducir la hepatocitoxicidad de algunos agentes anti-cáncer. Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados de la invención pueden ser coadministrados ó coformulados con agentes adicionales, ó formulados para la administración consecutiva en cualquier orden.

Agentes representativos útiles para la terapia de combinación, incluyen cualquiera de las drogas descritas aquí anteriormente, como útiles para las preparación de conjugados anti-5T4/droga. Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados de la invención, también pueden ser usados en combinación con otros anticuerpos terapéuticos y conjugados de anticuerpo/droga, incluyendo anticuerpos anti-5T4 distintos a los anticuerpos anti-5T4 humanizados descritos, lo mismo que anticuerpos anti-CD19, anti-CD20 (por ejemplo, RITUXAN®, ZEVALIN®, BEXXAR®), anticuerpo anti-CD22, anticuerpo anti-CD33 (por ejemplo,

MYLOTARG®),conjugados de anticuerpo/droga anti-CD3, ancuerpos anti-Lewis Y (por ejemplo, Hu3S193, Mthu3S193, AGmthu3S193), anticuerpos anti-HER-2 (por ejemplo, HERCEPTIN® (trastuzumab), MDX-210, OMNITARG® (pertuzumab, rhuMAb 2C4)), anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, CAMPATH®), anticuerpos anti-EGFR (por ejemplo, ERBITUX® (cetuximab), ABX-EGF (panitumumab)), anticuerpos anti-VEGF (por ejemplo, AVASTIN® (bevacizumab)), anticuerpos de complejo anti-ADN/histona (por ejemplo, ch-TNT-1/b), anticuerpos anti-CEA (por ejemplo, CEA-Cide, YMB-1003) hLM609, anticuerpos anti-CD47 (por ejemplo, 6H9), anticuerpos anti-VEGFR2 (ó receptos que contiene un inserto de quinasa, KDR) anticuerpo (por ejemplo, IMC-1C11), anticuerpos anti-Ep-CAM (por ejemplo, ING-1), anticuerpos anti-FAP (por ejemplo, sibrotuzumab), anticuerpos anti-DR4 (por ejemplo, TRAIL-R), anticuerpos de receptos anti-progesterona(por ejemplo, 2C5), anticuerpos anti-CA19.9 (por ejemplo, GIVAREX®) y anticuerpos anti-fibrina (por ejemplo, MH-1).

Los conjugados de anticuerpo/droga de Anti-5T4también pueden ser administrados juntos con una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento. Las combinaciones citotóxicas útiles para éste propósito incluyen CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona y procarbazina); CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona); COP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona); CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazina, bleomicina, vincristina y prednisona); m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorina; ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina,

ciclofosfamide, etoposida, leukovorina, mecloetamina, vincristina, prednisona y procarbazina); ProMACE-CytaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etoposida, leukovorina, citarabina, bleomicina y vincristina); MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina y leukovorina); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona y procarbazina); ABVD (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona y procarbazina) alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona y procarbazina) alternando con ABVD(adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina); ChIVPP (clorambucil, vinblastina, procarbazina, prednisona); IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, etoposida); MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, etoposida); DHAP (dexametasona, hcitarabina de dosis alta y cisplatina); ESHAP (etoposida, metilpredisolona, citarabina HD, Y cisplatinA); CEPP(B) (ciclofosfamida, etoposida, procarbazina, prednisona y bleomicina); CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina y prednisona); y CVP-1 (ciclofosfamida, vincristina y prednisona); DHAP (cisplatina, citarabina de dosis nata y dexametasona); CAP (ciclofosfamida, doxorubicina, cisplatina); PV (cisplatina, vinblastina ó vindesina); CE (carboplatina, etoposida); EP (etoposida, cisplatina); MVP (mitomicina, vinblastina ó vindesina, cisplatina); PFL (cisplatina, 5-flurouracilo, leucovorina); IM (ifosfamida, mitomicina); IE (ifosfamida, etoposida); IP (ifosfamida, cisplatina); MIP (mitomicina, ifosfamida, cisplatina); ICE (ifosfamida, carboplatina,

etoposida); PIE (cisplatina, ifosfamida, etoposida); Viorelbina y cisplatina; Carboplatina y paclitaxel; CAV (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina); CAE (ciclofosfamida, doxorubicina, etoposida); CAVE (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, etoposida); EP (etoposida, cisplatina); y CMCcV (ciclofosfamida, metotrexato, lomustina, vincristina).

Los conjugados de Anti-5T4/caliqueamicinapueden ser usados en combinación con drogas anti-cáncer sistémicas, tales Composición epitilonas (BMS-247550, Epo-906), reformulaciones de taxanos (Abraxane, Xyotax), inhibidores de microtubulina (MST-997, TTI-237), í con citotoxinas objetivadas, tales como CMD-193 y SGN-15. Los agentes anti-cáncer útiles adicionales incluyen TAXOTERE®, TARCEVA®, GEM2AR® (gemcitabina), 5-FU, AVASTIN , ERBITUX®, TROVAX®, anatumomab mafenatox, letrazol, docetaxel, y antraciclinas.

Las terapiąs de combinación, un anticuerpo anti-5T4 humanizado, y agentes terapéuticos y de diagnósticos, son administrados dentro cualquier cuadro de tiempo adecuado para el desempaño de la terapia propuesta o del diagnóstico propuesto. Así, los agentes únicos pueden ser administrados substancialmente, simultáneamente (es decir, como una formulación única ó dentro de minutos u horas), ó consecutivamente en cualquier orden. Por ejemplo, tratamientote de agentes únicos, pueden ser administrados dentro de cerca de un año, uno del otro, tal como, dentro de cerca de 10, 8, 6, 4, ó 2 meses, ó dentro 4, 3, 2 ó 1 semana, ó dentro de cerca de 5, 4, 3, 2 ó 1 día. La administración del conjugado de anti-5T4/caliqueamicina, y el segundo agente terapéutico

preferiblemente produce un efecto mayor de la administración de cualquiera de cualquiera de ellos solos.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos han sido incluidos para ilustrar los modos de la invención. Ciertos aspectos de los siguientes ejemplos se describen en términos de técnicas y procedimientos encontrados o contemplados por los presentes co-inventores para trabajar bien en la práctica de la invención. Estos ejemplos ilustran prácticas de laboratorio estándar de los co-inventores. En claridad de la presente invención y de la técnica, aquellos expertos apreciarán que los siguientes ejemplos están destinados a ser sólo de ejemplo y que numerosos cambios, modificaciones y alteraciones se pueden emplear sin apartarse del alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Expresión de 5T4 en tejidos normales y malignos

Para considerar el antígeno 5T4, como un objetivo para la terapia contra el cáncer, la distribución de 5T4 en tejidos normales y malignos fue determinada. El 5T4 fue observado en altos niveles en la superficie de varias células tumorosas, y en algunos casos correlacionados con la progresión de la enfermedad, y estaba sustancialmente ausente de la mayoría de las células normales. Éste perfil de expresión sugirió que el 5T4 es un objetivo producible para la inmunoterapia del cáncer.

La expresión del 5T4 el tejidos normales y cancerosos, fue ensayada usando el anticuerpo anti-5T4 H8 de la murina, de acuerdo con técnicas estándar, tales como el manchado Western. La finidad de varios anticuerpos y conjugados para el 5T4 fue verificada por resonancia de plasmon ó análisis FACS. El H8 es un hibridoma, generado del anticuerpo monoclonal IgGI de ratón, que se ha descrito en la publicación internacional PCT No. WO 98/55607 y en Forsberg et al. (1997) J. Biol. Chem. 272(19):124430-12436. Para ser uso como un control positivo en los ensayos in vitro e in vivio, las células de tumornque expresan altos niveles reproduciblemente de 5T4 fueron establecidas por medio de transfectar un vector que expresa el 5T4 en carcinoma de colon CT26 de ratón y MDAMB435 como células de carcinoma de pecho humano. Ver Fig.1 y Tabla 1.

Los muestras de tumor ensayadas incluyeron carcinoma de pulmón escamoso/adenomatoso (carcinoma de pulmón de células no pequeñas), carcinoma de pecho invasivo, carcinoma colorectal, carcinoma gástrico, carcinoma cervical escamoso, adenocarcinoma endometrial invasivo, carcinoma del páncreas invasivo, carcinoma de ovarios, carcinoma escamoso vesical y coriocarcinoma. El 5T4 fue detectado en altos niveles en carciunomas de bronquios, pecho, colon, recto, estómago, cervix, endometrio, páncreas, ovarios, corio y vesícula seminal. La distribución de superficies celular del antígeno de 5T4 (por ejemplo homogéneo o heterogéneo), vario de acuerdo con el tipo de tumor.

Para ensayarla localización celular del antígeno 5T4, las células que expresan 5T4 fueron cultivadas como monocapas, y luego expuestas al anticuerpo biotimilado de murina H8. Luego de la lisis celular, el antígeno 5T4 que se liga a la membrana fue separado por el ligado con avidina, y el 5T4 intracelular fue detectado en la fracción de ligado sin avidina. Ver Fig.2.

Para cuantificar el porcentaje del antígeno 5T4 prsente sobrre la superficie celuar, extractos de cultivos biotinilados y de control de CT26/5T4 fueron mezclados con perlas recubiertas con avidina.

El análisis de manchado Western, fue llevado a cabo sobre proteínas en el sobrenadante, y la cantidad de 5T4 fue estimada por densitrometría. Ver las Figuras 3A-3B. Con base en las ecuaciones de las líneas de regresión lineales, determinadas por la dilución de la muestra, y la densidad óptica de la banda reactiva del H8, la cantidad de 5T4 en la membrana celular (5T4M), fue calculada usando la fórmula; 100*(1-densidad óptica interna/densidad óptica total). El 5T4M fue calculado para tres tipos de células: CT26/5T4, 24%; PC3-MM2, 15%, N87, 41%.

La localización de la membrana de 5T4 en células DLD-1 (células de carcinoma de colon humano), células N87 (células de carcinoma gástrico humano), células PC3-MM2 (células de carcinoma de próstata humana), y células PC3 (células de carcinoma de próstata humano) se determinó por el análisis de manchado Western, luego del vaciado de la avidina de los cultivos celulares biotinilados. Ver Figura 4. La localizació de la membrana de 5T4 sobre células

MDAMB435/5T4 (células de cáncer de pecho humano) se determino por el análisis FACS. Ver Figuras 5A-5B. La localización de la membrana de 5T4 sobre células N87, PC14PE6, y NCI- H157, se determinó por análisis FACS. Ver Figura 6. La localización de membrana del antígeno 5T4 sobre células PC3-MM2 fue también determinada por detección histoquímica en muestras de tejido.

Para determinar si el anticuerpo H8 es internalizado luego del ligado al antígeno 5T4, la cantidad de anticuerpo detectado en la superficie celular, fue determinada durante un periodo de varias horas. La desaparición de H8 de la superficie de las células CT26/5T4 demuestra la internalización del complejo 5T4/H8. Ver Figura 7.

La Tabla 1, resume la expresión de 5T4 en células de tumor. En el carcinoma colorectal, el carcinoma gástrico, y el carcinoma de ovarios, la expresión de 5T4 está directamente relacionada con la progresión de la enfermedad. En el carcinoma de pecho, la intensidad es incrementada de el manchado de 5T4 sobre nodulos metastáticos fue observado. Sin embargo, ninguna correlación se encontró entre la expresión de 5T4 en tumores primarios y el estado de la enfermedad. Ver Tabla 2.

Tabla 1

Expresión de 5T4 en Células de Tumor

Línea de células	Carcinoma	Expresión de 5T4	Presencia de 5T4 en la membrana celular	
		Manchado Western	Manchado Western + biotinilización	FACS
DLD-1	Colon	2/2[a]	1/1	10[b]
GEO	Colon	0/2	n.d.	4.0
HCT116	Colon	1/1	n.d.	2.2
HT29	Colon	2/2	0/1	2.7
LOVO	Colon	0/2	0/1	3.3
HCA7	Colon	1/1	n.d.	8.0
MDAMB361	Pecho	3/3	2/2	38.0, 38.0, 34.0
MDAMB435	Pecho (melanoma?)	0/2	n.d.	2.4

PC3	Próstata	4/4	1/1	3.0
PC3MM2	Próstata	6/6	2/2	11.0, 14.0
H157	Pulmón (NSCLC)	n.d.	1/1	36.3, 41.8
PC14	Pulmón (NSCLC)	1/1	n.d.	3.5
PC14/PE6	Pulmón (NSCLC)	1/1	n.d.	3.6
N87	Gástrico	4/4	3/3	7.6
JAR	Corio	2/2	1/1	9.0
JEG	Corio	2/2	1/1	2.3
LOX	Malanoma	2/2	0/1	0.2, 0.9
A431	Cervix	3/3	1/2	2.3, 2.3
BXPC3	Páncreas	1/1	n.d.	3.9

(a) = Fracción de cultivos positivos 5T4

(b) = Fluorescencia media de canal relativa = MCF luego de manchado con H8 / MCF luego de manchado con mIgG

335

Tabla 2

Expresión de 5T4 en Carcinoma de Pecho

	neoplasia		anaplasia primaria			
metastático						
	Fibrocístico benigno	**Fibroadenoma benigno**	**Grado 1**	**Grado 2**	**Grado 3**	**Metastático CA**
Expresión	67% (6/9)	80% (4/5)	75% (3/4)	100% (4/4)	89% (8/9)	100% (19/19)
100%	33% (3/9)	60% (3/5)	75% (3/4)	75% (3/4)	78% (7/9)	68% (13/19)
90%		0%	0%	0%	0	
75%	}	0%	0%	0%	1% (1/9)	}
50%	} 33% (3/9)	20% (1/5)	0%	25% (1/4)	0%	} 32% (6/19)
25%		0%	0%	0%	0%	
0%	33% (3/9)	20% (1/5)	25% (1/4)	0%	11% (1/9)	0%
Intensidad						
4+	0%	0%	0%	0%	0%	0%
3+	11% (1/9)	0%	0&	25% (1/4)	} 22% (2/9)	**47% (9/19)**
2+		0%	25% (1/4)	} 75% (3/4)		**37% (7/19*)**
1+	} 56% (5/9)	80% (4/5)	50% (2/4)		67% (6/9)	16% (3/19)
						***=4/19=1-2+**

00335
336

Ejemplo 2

Preparación y caracterización de conjugados

Anti-5T4 Caliqueamicina (CM)

El anticuerpo H8 de murina fue usado para la preparación de los conjugados anticuerpo/droga. Los conjugaos fueron entonces ensayados in vitro, para en cuanto su habilidad para ligar al antígeno 5T4 humano, y para inducir
la histolisis de las células de cáncer. Tres enlazadoes fueron usados para ligar la caliqueamicina al H8: 4-(4'- acetilfenoxi) ácido butanóico (AcBut), ácido 3-acetilfenil acídico (AcPac) y ácido 4-mercapto-4-metil-pentanóico (Amida). Para incrementar la cantidad de caliqueamicina en los conjugados H8-caliqueamicina, el anticuerpo fue conjugado al PEG antes de la conjugación con la caliqueamicina, por ejemplo, usando PEG-SPA, PEG-SBA, y PEG-bis-maleimida. En la Tabla 4, la eficiencia de cada uno de los conjugados H8-caliqueamicina se informa como ED50, que es la cantidad de caliqueamicina dada como conjugado o como droga libre que causó 50% de la reducción de un cultivo celular con relación a un control no tratado. El número de células fue determinado usando una tintura vital (MTS).

El enlace directo de la caliqueamicina al H8 vía el AcBut (ácido 4-(4'-acetilfenoxi) butanóico) enlazador hidrolizable en ácido mostró dificultad y generó la mayor parte del conjugado agregado y el conjugado con bajas cantidades de CM por anticuerpo (aproximadamente 1 mol/mol). El najo nivel de conjugación y las

propiedades de agregación de los complejos resultantes hicieron éstos complejos inadecuados para su uso.

El ligado de la caliqueamicina al H8 mediante el enlazador de amida estable (ácido 4-mercapto-4-metil- pentanóico) resultó en un conjugado que fue 200 veces más more citotóxico contra un carcinoma que expresa 5T4 cuando se comparo con su contraparte negativa 5T4. Ver Figura 8 y Tabla 4. Al final de ésta selectividad, el conjugado fue menos citotóxico que la caliqueamicina libre, y fue incapaz de destruir completamente el cultivo celular en concentraciones de 500 ng de caliqueamicina por ml del medio.

Los conjugados preparados usando polietilenglicol (PEG), H8, caliqueamicina, y el enlazador AcBut no formo agregados, y tuvo una carga de aproximadamente 6 moles de caliqueamicina por mol de H8. Múltiples tipos de PEG ensayados redujeron el ligado de H8 al 5T4 en 50% a 90%. Ver Tabla 3.

Tabla 3

Actividad de ligado del anticuerpo H8/PEG

	MW	Ligado del H8PEG*	
Nombre	(kDa)	BIACORE®	FACS
PEG-SPA(PEG2K)	2	69%	64%
PEG-SBA(PEG5K)	5.3	79%	79%
PEG-bis-maleimida(PEGmal2)	3.4	43%	No determinado

*La fracción de ligado del 5T4 perdió luego de la modificación del anticuerpo

A pesar del ligado reducido, dos conjugados de H8PEG-AcBut-CalichDMH, H8PEG2K- AcBut-CalichDMH y H8PEGmal2-AcBut-CalichDMH, probó eficacia selectiva para inducir citólisis de células que expresan 5T4 in vitro. La citotoxicidad selectiva, fue observada por los conjugados H8-caliqueamicina que retuvieron solamente cerca del 30% de la actividad de ligado. El H8PEG2K-AcBut-CalichDMH fue también más citotóxico que la caliqueamicina libre, y destruyó completamente el cultivo celular en concentraciones de 500 ng de caliqueamicina por ml de medio. Ver las Figuras 9A-9B y la Tabla 4.

337

Tabla 4

Ciotólisis selectiva de células que expresan 5T4 mediante conjugados H8-Caliqueamicina

Tratamiento				Líneas de células					
				MDAMB435		MDAMB435/neo		MDAMB435/5T4	
Nombre	Anticuerpo	PEG	Enlazador	ED_{50} (ng/ml)	Rango (ng/ml)	ED_{50} (ng/ml)	Rango (ng-ml)	ED_{50} (ng/ml)	Rango (ng-ml)
CM	Ninguno	Ninguno	Ninguno	3.80(4)[a]	0.70-7.00	11.90(7)	2.00-3.00	10.50(6)	5.00-2.00
CMA	P67.6	Ninguno	AcBut	41.00(3)	23.00-70.00	50.00(5)	20.00-90.00	55.00(4)	20.00-80.00
H8-CM	H8	Ninguno	AcBut	3.00(1)	3.00-3.00	2.30(1)	2.30-2.30	0.04(1)	0.04-0.04
H8~CM	H8	Ninguno	AcPac	n.d.	n.d.	1.00(1)	1.00-1.00	0.02(1)	0.02-0.02
H8^CM	H8	ninguno	Amida	n.d.	n.d.	40.00(1)	40.00-40.00	0.18(1)	0.18-0.18
H8PEG2K-CM	H8	PEG2K	AcBut	31.00(2)	12.00-50.00	41.50(2)	23.00-60.00	2.60(2)	2.00-3.20
H8PEG5K-CM	H8	PEG5K	AcBut	36.00(2)	22.00-50.00	45.00(2)	40.00-50.00	31.50(2)	33.00-33.00
H8PEGmal2-CM	H8	PEGmal2	AcBut	n.d.	n.d.	7.00(1)	7.00-7.00	0.90(1)	0.90-0.90

Los números en los paréntesis indican los números de experimentos.

003/39
340

Ejemplo 3

Eficacia Antitumor de Conjugados H8-Caliqueamicina Usando Xenoinjertos Subcutáneos

Para determinar la citotoxicidad de los conjugados de H8-caliqueamicina *in vivo*, se prepararon tumores en ratones desnudos mediante inyección subcutánea de células MDAMB435/5T4 (células de carcinoma de pecho humano que sobreexpresan el antígeno 5T4 humano), células NCI-H157 (células de cáncer de pulmón humano no pequeñas), células PC14PE6 (células de cáncer de pulmón células humanas no pequeñas), o células N87 (células de carcinoma gástrico humano). Los conjugados H8-caliqueamicina y los compuestos de control fueron administrados mediante inyección intraperitoneal a ratones que tenían tumor en un total de 3 dosis dadas en intervalos de 4 días, es decir, en los días 1, 5, y 9. Los conjugados de H8-caliqueamicina inhibieron el crecimiento de todos los tipos de tumor. Ver figuras 10, 11A-11B, 12, 13A-13B, y 14.

Ejemplo 4

Eficacia Antitumoral de los conjugados H8-Caliqueamicina Usando un Modelo Ortotópico de Cáncer de pulmón humano

Para determinar adicionalmente la habilidad de objetivación de los anticuerpos que tienen conjugados H8-caliqueamicina, un modelo ortotópico para células no pequeñas y células pequeñas de cáncer fue cruzado, esencialmente como se describió por Onn et al. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9(15):5532-5539. En resumen, las células de adenocarcinoma de pulmón humano (PC14PE6) fueron

inyectadas en las venas de la cola de ratones desnudos, que luego migraron para formar tumores en el pulmón. Los tumores aparecieron como nódulos sólidos en el parenquima del pulmón y causaron efusiones hemorrágicas pleurales que contenían las celulas de tumor suspendidas. Ver las figuras 15A-15G. La inyección de los compuestos de control y los conjugados de H8-caliqueamicina fueron administrados mediante inyección intraperitoneal a los ratones que tenían los tumores iniciando en el día sexto después de la inyección de las células de tumor para un total de 3 dosis dadas en intervalos de 4 días, es decir, en los días 6, 10, y 14. La administración de los conjugados H8-caliqueamicina resultó en una supervivencia incremental de animales que llevaban los tumores. Ver figura 16. La administración de anticuerpo H8 no conjugado o el control conjugado de CMA no redujo las efusiones pleurales. Sin embargo, un CMS ligeramente incrementó la sobrevivencia promedio de los ratones que llevaban el tumor. Ver figura 17.

Ejemplo 5

Preparación y Caracterización de Anticuerpos Anti-5T4 Humanizados

Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados fueron preparados usando secuencias derivadas del anticuerpo H8 de murina y secuencias del anticuerpo humano. Las secuencias de los anticuerpos representativos de la invención se muestran el las Figuras 27A-27F.

Los anticuerpos H8 quiméricos fueron construidos con secuencias de regiones de cadena pesada y cadena liviana variable

de H8 de murina y secuencias de regiones constantes humanas (Figuras 27A-27B). Las regiones constantes humanas representativas que fueron usadas para preparar los anticuerpos quiméricos y humanizados H8 incluyen aquellas de IgG1 humano, kappa humano, y IgG4 humano. Las mutaciones fueron introducidas opcionalmente para alterar las funciones efectoras de la región constante, tal como la citotoxicidad dependiente de célula (CDC), la lisis complementaria, y la citoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Ver figuras 26A-26B. Parar lograr las regiones constantes de IgG que codifican las secuencias, las secuencias intronicas pueden ser eliminadas opcionalmente. Ver ejemplo 6. Los anticuerpos fueron también preparados en donde una cadena de anticuerpo comprende la región variable de H8 de murina (como en el anticuerpo quimérico) y la otra cadena de anticuerpo comprende una región variable H8 humanizada, es decir, un anticuerpo semihumanizado (Figure 27C).

Las regiones variables de H8 humanizadas fueron construidas para incluir los CDR del H8 de murina injertado en regiones de marco de trabajo humanas o sustancialmente humanas. Los CDR del anticuerpo H8 de murina fueron identificados usando la definición AbM, que esta basada en la variabilidad de las secuencia como también de la localización de las regiones de lazo estructural. Los marcos de trabajo aceptores humanos fueron seleccionados sobre la base de que ello eran sustancialmente similares a las regiones de marco de trabajo de anticuerpo H8 de murina, o las cuales fueron más similares a la secuencia de consenso de la subfamilia de región variable. Ver figuras 18-23. La consideración también fue dada para la representación del lugar

de la estructura de trabajo en humanos, tal como las secuencias ampliamente representadas que fueron preferidas cobre secuencias menos populosas. Las mutaciones adicionales de las secuencias aceptoras del marco de la estructura humana fueron hechas, por ejemplo para restaurar los residuos de murina que se cree que están involucrados en los contactos de antígeno y/o los residuos involucrados en la integridad estructural del sitio por ligado de antígeno. La secuencia de aminoácido también puede optimizar para la preferencia de codón de células CHO y para remover los sitios de restricción de enzima. Un programa de de predicción de estructura de péptidos fue usado para analizar las secuencias de región pesada y liviana variables humanizadas para identificar y evitar los sitios de modificación de proteína postranslacional introducidos por el diseño de la humanización. Usando esta estrategia, 3 versiones de regiones variables de H8 humanizadas. La versión 1 retiene los residuos H8 de murina dentro de la secuencia de la estructura que se cree que es crítica para la integridad del anticuerpo y el ligado del antígeno. La versión 2 retiene los residuos de murina solamente en los CDR. La versión 3 es similar a la versión 2, con la excepción que una secuencia de región de consenso fue usada como la estructura aceptora de cadena pesada. La región variable de cadena liviana del anticuerpo de la versión 3 es igual a aquella del anticuerpo de la versión 2. Ver figuras 24A-24C.

La regiones pesada y liviana variables del anticuerpo H8 anti-5T4 fueron clonadas usando la síntesis SMART® cADN (Clontech) seguida por amplificación PCR. El cADN fue sintetizado a partir de 1 µg de ARN total aislado de las células de hibridoma

00343
344

H8, usando oligo(dT) y el oligo SMART IIA con POWERSCRIPT™ como transcriptasa inversa (Clontech). El cADN fue entonces amplificado por PCR usando un cebador que templa las secuencias oligo SMART® IIA y un cebador especifico de la región constante humana (Kappa de ratón para la cadena liviana, IgGI de ratón para la cadena pesada) con polimerasa VENT®. Los productos PCR de las cadenas pesada y liviana fueren subclonados en el vector de expresión pED6 y la secuencia de ácido nucleico fue determinada. Este método es ventajoso en que no se requirió un conocimiento anterior de la secuencia de ADN. En adición, la secuencia de ADN resultante no esta alterada por el pulso de cebadores PCR degenerados.

Diversas discrepancias fueron notadas entre las secuencias de nucleótido H8 de murina cuando se comparó con la secuencia de nucleótido publicada (Publicación Internacional PCT No. WO 98/55607 y en Forsberg et al. (1997) J. Biol. Chem. 272(19): 124430-12436). Las diferencias anotadas no alteran la secuencia de la proteína. La diferencia de T (publicado) al C presenta en el codón para el aminoácido 133 de la región variable de cadena pesada se correlaciona con los codones ACT y ACC, respectivamente. Tanto el código ACT y el ACC para el aminoácido treonina (T). La diferencia T (publicado) a C presente en el codón para el aminoácido 138 de la región de variable de cadena pesada se correlaciona con los codones TCT y TCC, respectivamente. Tanto los códigos TCT y TCC para el aminoácido serina (S). La diferencia de A (publicado) a C que se presenta en el codón para el aminoácido 126 de la región de variable de cadena liviana se correlaciona con los codones ATA y ATC,

respectivamente. Ambos códigos ATA y ATC son para el aminoácido isoleucina (I).

Para la construcción de regiones variables de cadena liviana de H8 humanizado, la secuencia de la línea germinal DPK24 VL-IV/locus B3 fue usada como la estructura aceptor. La secuencia DPK24 es 68% idéntica a la región variable de cadena liviana H8 de murina y contiene 18 sustituciones de aminoácidos cuando se comparo la secuencia de la estructura de la cadena liviana de H8 de murina. La versión 1 de la región variable de cadena liviana del H8 humanizado mantuvo los residuos de H8 S43, S49, y F87. Las mutaciones que fueron determinadas para incrementar la expresión incluyen F10S, T45K, I63S, Y67S, F73L, y T77S. Ver figura 18.

Los anticuerpos humanizados también fueron construidos usando regiones de estructura de la región variable de cadena liviana de los subgrupos de clon V_KIII y V_KI. Ver las figuras 19-20. En particular, los anticuerpos que incluyen las cadenas livianas de los subgrupos V_KIII de las regiones de estructura y la versión 1 del anticuerpo H8 humanizado descrita son ambas altamente expresadas y estables. Nueve mutaciones (T7S, D17E, V19A, S50Y, I63S, Y67S, F73L, T77S, y F87Y) para la humanización de la región variable de cadena liviana del H8 sobre las estructuras de líneas germinales V_KIII L16, L2, A27, L6, L10, y L25 han sido introducidos en la versión 2 del anticuerpo H8 humanizado y no comprometen la afinidad de ligado. Similarmente, 10 mutaciones (T7S, F10S, V19A, T46K, S50Y, I63S, T67S, F73L, T77S, y F87Y) para la humanización de la región de variable de cadena liviana del H8 con base en las estructuras de líneas

germinales del subgrupo V_KI han sido introducidas en el anticuerpo H8 humanizado sin afectar su afinidad para el ligado. En adición, las sustituciones de aminoácido en las posiciones 1, 9, 10, 12, 15, 22, 43, 45, y 83 de la región variable de cadena liviana H8 no afectan el ligador antígeno.

Para la construcción de regiones variables de cadena pesada de H8 humanizado, la secuencia de línea germinal DP75 VH-I/locus 1-02 fue usada como la secuencia aceptora. La secuencia DP75 es 65% idéntica a la región variable de cadena pesada de H8 y contiene 28 sustituciones de aminoácido cuando se comparo con la secuencia de estructura de la cadena pesada de H8 de murina. La versión 1 de la región variable de cadena pesada de H8 humanizado mantuvo los residuos K38 y S40 del H8 de murina, que son importantes para el contacto con el antígeno cuando las regiones variables de cadena pesada y cadena liviana, lo mismo que I48, que es importante para el contacto de antígeno con las regiones variables y con CDR2. Ver figura 21. Alternativamente, la versión 3 de la cadena pesada H8 humanizada fue preparada usando la secuencia de consenso del subgrupo de la región variable de cadena pesada. La secuencia de consenso contiene 25 sustituciones de aminoácidos cuando se comparó con la secuencia de estructura de cadena pesada del H8 de murina. Ver figuras 22-23.

Las regiones variables de cadena pesada y cadena liviana del H8 humanizado fueron construidas mediante templar junto los oligonucleótidos sobrepuestos y ligarlos en el vector de expresión pED6 que contiene una región constante de anticuerpo humano. Las regiones variables de cadena pesada y liviana

humanizada pueden también ser construidas usando mutagénesis PCR o mutagénesis dirigida a sitio. El diseño de los oligonucleótidos incluidos la optimización del uso del codón para la expresión celular CHO y la remoción de los sitios de restricción de enzima. Un sitio de restricción BglII fue removido de la región pesada variable del H8. Los oligonucleótidos usados para sintetizar la versión 1 de la región variable de cadena liviana del H8 humanizado se establece como el SEQ ID NOs: 27-32. Los oligonucleótidos usados para sintetizar la versión 2 de la región variable de la cadena liviana del H8 humanizado se establece como SEQ ID NOs: 33-36. Los oligonucleótidos usados para sintetizar la versión 1 de la región variable de cadena pesada es H8 humanizado se establecen como SEQ ID NOs: 37-44. Los oligonucleótidos usados para sintetizar la versión 2 de la región variable de cadena pesada de H8 humanizado se establecen como SEQ ID NOs: 37, 39-42, y 44-46. Los oligonucleótidos usados para sintetizar la versión 3 de la región variable de cadena pesada del H8 humanizado se establecen como SEQ ID NOs: 37, 40, 41, y 44-48.

Para determinar la novedad de las secuencias de región variable de H8 humanizado, búsquedas BLASTp (búsqueda de secuencias de proteína) fue conducida usando parámetros por defecto de un filtro de baja complejidad, Expect=10, Word Size=3, y la matriz BLOSUM62, que permite espacios de costos de existencia=11, y extensión=1. Las búsquedas BLASTn (para búsqueda de secuencias de nucleótidos) fueron conducidas usando parámetros por defecto de Expect=10, Word Size=11, y un filtro de complejidad baja. Los resultados de la búsqueda final son reportados como una lista de secuencia relacionada a la secuencia

de la pregunta, raqueada o clasificada en orden del valor E, es un indicador de la significancia estadística de los casos identificados en la base de datos. Las secuencias más cercanamente relacionadas a las secuencias de la región variable humanizada usadas por el análisis BLAST son identificadas en la tabla 5 (BLASTp) y la tabla 6 (BLASTn). Los resultados BLAST y una alineación de cada secuencia de consulta con la secuencia sujeto relacionada más cercana se muestran en las Figuras 25A-25O.

Tabla 5

Análisis BLASTp

Secuencia de Consulta	Identidad (%) de las Secuencias objeto más cercanas	Descripción de las secuencias objeto más cercana	Figura
Versión 1 VL (SEQ ID No: 17)	77%	gi|229528|prf|751423A proteína Len, Bence-Jones	25A
Versión 2 VL (SEQ ID No: 23)	80%	gi|229528|prf|751423A proteína Len, Bence-Jones	25C
Versión 1 VH (SEQ ID No: 18)	82%	gi|161791|gb|AAB16857.1 *Homo sapiens* immunoglobulin IgM región VH1 de cadena pesada	25B
Versión 2 VH (SEQ ID No: 21)	85%	gi|161791|gb|AAB16857.1 *Homo sapiens* immunoglobulin IgM región VH1 de cadena pesada	25D
Versión 3 VL (SEQ ID No: 19)	80%	gi|17939658|gb|AAH19337.1| proteína *Homo sapiens* IGHG1	25E

Tabla 6

Análisis Blasón

Secuencia de Consulta	Identidad (%) de las Secuencias objeto más cercanas	Descripción de las secuencias objeto más cercana	Figura
Versión 1 VL (SEQ ID No: 81)	90%	gi|7769338|gb|AF206032.1 Hibridoma mus musculus 16B2-A1 región variable de cadena liviana antimiosina de inmunoglobulina mARN, parcial cds	25J-25K
Versión 2 VL (SEQ ID No: 22)	89%	gi|7769338|gb|AF206032.1 Hibridoma mus musculus 16B2-A1 región variable de cadena liviana antimiosina de inmunoglobulina mARN, parcial cds	25F-25G
Versión 1 VH (SEQ ID No: 82)	93%	gi|34539549|gb|AY369876.1 Hibridoma mus musculus 16B2-A1 región variable de cadena pesada antimiosina de inmunoglobulina mARN, parcial cds	25L-25M
Versión 2 VH (SEQ ID No: 20)	90%	gi|4719385|emb|AJ045366.1 construcción sintética para el anticuerpo anti-PLAP ScFv, clon GLC4	25H-25I
Versión 3 VL (SEQ ID No: 83)	90%	gi|47109385|emb|AJ04536.1| construcción sintética para el anticuerpo anti-PLAP ScFv, clon GLC4	25N-25O

Para confirmar que los anticuerpos quiméricos y humanizados podrían ser expresados, las células COS-1 fueron transfectadas transitorio con un plásmido que codifica anticuerpos representativos anti-5T4 de la invención. Después de un periodo de 48 horas, el medio de cultivo celular fue ensayado para determinar los niveles de anticuerpos IgG humanos usando un ELISA. Como se muestra en la tabla 7, todos los anticuerpos anti-5T4 fueron expresados.

Tabla 7

Expresión de Anticuerpos Anti-5T4 Quiméricos y Humanizados

Anticuerpo	Medio en cultivo celular en IgG humano (µg/ml)	Incrementar el doblez en la expresión relativa al H8 quimérico
H8 quimérico (mVH/mVL)	0.5	--
H8 semihumanizado (mVH/hVL1)	8.4	17
Versión 1 de H8 humanizado (hVH1/hVL1)	3.6	7
Versión 2/1 de H8 humanizado (hVH1/hVL2)	2.0	4
Versión 1/2 de H8 humanizado (hHVL1/hVL2)	4.3	9
Versión 2 de H8 humanizado (hVH2/hVL2)	2.1	4

mVH, región variable de cadena pesada de H8 de murina

mVL, región variable de cadena liviana de H8 de murina

hVH1, Versión 1 de la región variable de cadena pesada del H8 humanizado

hVL1, Versión 1 de la región variable de cadena liviana del H8 humanizado

hVH2, Versión 2 de la región variable de cadena pesada del H8 humanizado

hVL2, Versión 2 de la región variable de cadena liviana del H8 humanizado

Para determinar la especificidad de ligado y la habilidad de los anticuerpos H8 quiméricos y humanizados, el análisis BIACORE® fue llevado a cabo usando el antígeno 5T4 humano inmovilizado sobre una pastilla CM5. En la tecnología BIACORE® utiliza los cambios en el índice de refracción en la capa de superficie luego del ligado del anticuerpo al antígeno 5T4 inmovilizado sobre la capa. El ligado es detectado por la resonancia plasmón de superficie (SPR) de la refracción de la luz láser de la superficie. El análisis de la cinética de la señal en la rata y fuera de rata permite la discriminación entre interacciones no específicas y específicas. La concentración del anticuerpo cruzado estaba en el rango de 12.5 nM a 200 nM. Ver tabla 8. Los anticuerpos quiméricos, semihumanizados y humanizados de H8 se llevaron a cabo de manera similar al ensayo del anticuerpo de H8 de murina en el BIACORE®.

Tabla 8

Resultados del Ensayo BIACORE®

Anticuerpo	KD (M)	Kd (1/s)	Ka (1/Ms)
H8 de murina	5.8×10^{-10}	5.9×10^{-10}	1.0×10^{5}
H8 quimérico (mVH/mVL)	3.0×10^{-10}	4.2×10^{-5}	1.4×10^{5}
Versión 1 de H8 humanizado (hVH1/hVL1)	8.4×10^{-10}	7.8×10^{-5}	0.9×10^{5}
Versión 2 de H8 humanizado (hVH2/hVL2)	1.2×10^{-10}	1.3×10^{-5}	1.1×10^{5}
Versión 3 de H8 humanizado (hVH3/hVL2)	1.2×10^{-10}	1.9×10^{-5}	1.5×10^{5}

mVH, región variable de cadena pesada de H8 de murina

mVL, región variable de cadena liviana de H8 de murina

hVH1, versión 1 de la región variable de cadena pesada del H8 humanizado

hVL1, Versión 1 de la región variable de cadena liviana del H8 humanizado

hVH2, Versión 2 de la región variable de cadena pesada del H8 humanizado

hVL2, Versión 2 de la región variable de cadena liviana del H8 humanizado

hVH3, Versión 3 de la región variable de cadena pesada del H8 humanizado

Para determinar la selectividad del ligado, el análisis FACS fue llevado a cabo para detectar el antígeno 5T4 de las células MDAMB435/neo o sobre las células MDAMB435/5T4 usando versiones quiméricas de H8 de murina, y versiones humanizadas de H8, en las

concentraciones indicadas. Todos los anticuerpos mostraron un ligado selectivo a células que expresan 5T4. Ver figuras 28A-28B.

Las propiedades de ligado del anticuerpo H8 quimérico y de las secciones 1-3 del H8 humanizado fueron determinadas usando un ensayo de ligado competitivo como sigue. Platas ELISA fueron recubiertas con antígeno 5T4 humano, a cada pozo se le agrego 100µl de 1µg/ml de antígeno 5T4 en PBS-CMF con pH 7.2. Las placas fueron incubadas durante la noche a 4°C. Después de recubrir con el antígeno, las placas fueron lavadas en una solución de bloqueo de 0.02% de caseina en PBS-CMF, con pH 7.2 durante 2-4 horas a temperatura ambiente. Diluciones seriales de 250ng/ml de anticuerpo de H8 quimérico en amortiguador de ensayo (0.5% BSA + 0.02% TWEEN®-20 en PBS) se prepararon, se transfirieron a la placa ELISA recubierta y bloqueada, y se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas 4 veces con 200 µl de 0.03% TWEENO-20 en PBS. La señal se desarrollo durante 10-15 minutos a temperatura ambiente seguido por la adición de 100µl BIOFX® TMB (Biofx Laboratories, Inc. de Randallstown, Maryland) por pozo. La reacción se detuvo mediante la adición de 100µl por pozo de H_2SO_4 al 0.18 N. Todas las etapas de incubación y de lavado fueron llevadas a cabo con agitación suave. Las placas ELISA fueron leídas a 450nm. El ED50 del anticuerpo biotinilado que liga al antígeno fue determinado por graficación OD450 (puntos de datos duplicados promediados) como una función de la concentración del anticuerpo biotinilado. Las placas ELISA de competición fueron llevados a cabo mediante preparar las placas ELISA recubiertas y bloqueadas según se dijo antes, transferir a tales placas diluciones seriadas de el

anticuerpo de ensayo junto el anticuerpo de H8 quimérico biotinilado y la concentración ED50 fue calculada. La marca de biotin fueb amplificada usando estreptavidin-HRP diluido 1:10,000 en amortiguador de ensayo, seguido por el desarrollo de la señal y la cuantificación como se dijo anteriormente. Ver figura 29.

Para determinar so los anticuerpos anti-5T4 humanizados son internalizados luego del ligado al antígeno 5T4, la cantidad de anticuerpo detectado en la superficie celular de las células MDAMB435/5T4 fue determinada usando el análisis FACS como se describió en el Ejemplo 1. Como se observo para el anticuerpo de H8 quimérico y los conjugados de anticuerpo H8/caliqueamicina, los anticuerpos de H8 humanizado fueron internalizados por la células que expresaron 5T4. Ver figura 30.

Ejemplo 6

Expresión Transiente y Estable de Anticuerpos de H8 Humanizados

Para una producción a gran escala de anticuerpos H8 humanizados, las líneas de células CHO que expresan las versiones 1-3 del H8 humanizado fueron preparadas. En una etapa inicial, el nivel de producción de anticuerpos fue determinado siguiendo la expresión transiente de los vectores de codificación en células COS-1. Las cadenas livianas y pesadas del H8 humanizado que codifica el ADN fueron subclonadas en vectores de expresión bi-cistronicos pSMED2 (resistencia al metotrexato) y pSMEN2 (resistencia a la neomicina), respectivamente. Los tres anticuerpos H8 humanizados fueron expresados en niveles

similares, que eran mayores que lo observado para el anticuerpo H8 quimérico. Ver figura 31.

Para la expresión en células CHO, la región constante mutada del IgG4 humano fue optimizada adicionalmente mediante la remoción de tres intrones, lo que resulto en una expresión más alta y estabilidad de los anticuerpos H8 humanizado. Las líneas de células H8 que expresan los anticuerpos CHO humanizados fueron preparadas mediante co-transfectación de la cadena pesada pSMED2_huH8 y la cadena liviana pSMEN2_huH8 en la linea celular Dukx de CHO fue adaptada 153.8. El nivel de expresión del clon líder, seleccionado en 50 nM de metotrexato, tenía un titulo promedio de 17 mg/litro/24 horas y una productividad celular promedio de 10 $\mu g/10^6$ células/24 horas. El grupo líder, seleccionado en 50 nM de metotrexato y G418 (1 mg/ml), tienen un titulo promedio de 8 mg/litro/24 horas y su productividad celular promedio es de 6 $\mu g/10^6$ células/24 horas.

Ejemplo 7

Preparación y Caracterización de Conjugados de H8 Humanizado-Caliqueamicina

Los anticuerpos H8 humanizados fueron conjugados a la caliqueamicina esencialmente como se describió en el Ejemplo 2. Los aditivos de deoxicolato y decanoato de sodio cada uno produjo un conjugado con bajos niveles de proteína no conjugada y agregada. Ver tabla 9.

Tabla 9

Conjugación del H8 Humanizado y la Caliqueamicina a 5 mg de Escala de Producción

Final de los datos de reacción

Aditivo/conc	Proteína (mg/mL)	Carga (mcg/mg)	Agregado	LCF
Deoxicolato/10mM	5.27	78.9	7.1	1.88
Decanoato/37.5mM	4.95	84.8	7.07	0

La cinética de ligado de conjugado de H8 murina, H8 humanizado, y H8 humanizado/caliqueamicina fueron comparados por resonancia de plamón, esencialmente como de describió en el ejemplo 2. La muestra conjugada contenía 61 µg de CalichDMH por mg de proteína, 1% de anticuerpo libre, y 1.4% de agregado. Las propiedades de ligado de los conjugados de la versión 2 de H8 humanizado-caliqueamicina fueron comparables a aquellas de los conjugados de H8 de murina-caliqueamicina (Tabla 10), indicando que ni la humanización del anticuerpo ni la conjugación a la caliqueamicina afectaron el ligado a 5T4. Estos resultados fueron confirmados independientemente mediantes determinar el ligado de anticuerpo y conjugados sobre células de tumor que expresan 5T4 usando citometria de flujo.

Tabla 10

Resultados del Ensayo BIACORE® usando conjugados de anticuerpo/Caliqueamicina (CM)

Conjugado	KD (M)	Kd (1/s)	Ka (1/Ms)
H8 de murina/CM	5.8×10^{-10}	5.9×10^{-5}	1.0×10^{5}
Versión 2 de H8 humanizado/CM	1.7×10^{-10}	2.0 C 10^{-5}	1.2×10^{5}

Versión 2 de humanizado/AcBut/CalichDMH	H8	2.6×10^{-10}	3.4×10^{-5}	1.3×10^{5}

Ejemplo 8

Eficacia Antitumor de los Conjugados de H8 Humanizado-Caliqueamicina In Vitro

Para determinar la citotoxicidad de los conjugados de H8 humanizado-caliqueamicina in vitro, se cultivaron células MDAMB435/5T4 (células de carcinoma de pecho humano que sobreexpresan el antígeno 5T4 humano) y células MDAMB435/neo (células de control) en la presencia de conjugados de anticuerpo-caliqueamicina o caliqueamicina libre, esencialmente como se describió, por Boghaert et al. (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10: 4538-4549. En la tabla 11, la citotoxicidad de cada agente es reportada como ED50 (ng/ml), que la cantidad de caliqueamicina dada como conjugado como droga libre que cause el 50% de reducción en un cultivo celular con relación a un control no tratado. El número de células en el cultivo fue determinado usando una tintura vital (MTS) seguido por exposición a 96 horas de droga. El ED50 o el conjugado fueron inferiores consistentemente (3-veces 16-veces) cuando se agrego a las células MDAMB435/5T4 que cuando se agregó a las células MDAMB435/neo.

La citotoxicidad de los conjugados de H8 humanizados-caliqueamicina fueron también determinados usando células MDAMB435/5T4 y MDAMB435/neo cultivadas de una manera adecuada para crecimiento esteroide. Este modelo se aproxima a las

condiciones de un tumor en desarrollo y tiene una resistencia inherente mayor a las drogas citotóxicas. Otra ventaja del modelo es que este permite periodos de cultivo más largos. Luego de 144 horas de cultivo en la presencia de conjugados de anticuerpo-caliqueamicina o caliqueamicina libre, las dimensiones de cada esteroide fueron determinadas. Como se muestra en la tabla 12, el ED50 del huH8-AcBut-CalichDMH fue 6 veces inferior cuando se agrego a las células MDAMB435/5T4 que cuando se agrego a las células MDAMB435/neo.

Usando cualquier ensayo, los conjugados de H8 humanizado-caliqueamicina fueron sustancialmente más potentes para inducir citotoxicidad e inhibir el crecimiento esteroide cuando se comparó con la caliqueamicina libre o al CMA-676, un conjugado anti-CD33-caliqueamicina. La toxicidad selectiva de las células PC14PE6 pudieron demostrar en un ensayo de formación de colonia y un ensayo esteroide pero no en un ensayo de tinturado vital. Los resultados demuestran que la citotoxicidad de conjugado se relaciona directamente con la cantidad de 5T4 expresados por las células. En adición, el conjugado es más eficaz que la droga libre (CalichDMH) o el conjugado de control (CMA-676).

Tabla 11

Resultados para el Ensayo MTS

Células	MDAMB435/5T4		MDAMB435/neo	
Experimento	A	B	A	B
ED50 (ng/ml) CalichDMH	10	4	2.3	2.2
ED50(ng/ml) huH8-AcBut-CalichDMH	0.15	0.13	0.43	0.8

ED50(ng/ml) CMA-676	40	>400	30	70
Potencia X veces de huH8-acBut-CalichDMH comparado con el CalichDMH	100	31	5.3	2.8
Potencia X veces de huH8-AcBut-CalichDMH comparado con el CMA-676	267	>3,077	70	80

CalichDMH, caliqueamicina libre

huH8-AcBut-CalichDMH, conjugado de anticuerpo H8 humanizado a la caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut)

Anticuerpos CMA-676, y anti-CD33 conjugados a la caliqueamicina

Experimentos A & B, experimentos llevados a cabo en días separados

Tabla 12

Resultados para el Ensayo de Crecimiento Esferoide

Células	MDAMB435/5T4	MDAMB435/neo
ED50 (ng/ml) CalichDMH	1.6	2
ED50(ng/ml) huH8-AcBut-CalichDMH	0.5	0.08
ED50(ng/ml) CMA-676	11	3.2
Potencia X veces de huH8-acBut-CalichDMH comparado con el CalichDMH	3.2	25
Potencia X veces de huH8-AcBut-CalichDMH comparado con el CMA-676	22	40

CalichDMH, caliqueamicina libre

huH8-AcBut-CalichDMH, conjugado de anticuerpo H8 humanizado a la caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut)

anticuerpos CMA-676, y anti-CD33 conjugados a la caliqueamicina

Ejemplo 9

Eficacia Anti-Tumor de Conjugados de H8 Humanizado-Caliqueamicina Usando Xenoinjertos subcutáneos

para determinar la citotoxicidad de los conjugados de H8 humanizados-caliqueamicina in vivo, se prepararon tumores en ratones desnudos mediante la inyección subcutánea de células N87 (células del carcinoma gástrico humano), células MDAMB435/5T4 (células del carcinoma de pecho humano que sobreexpresan el antígeno 5T4 humano), o células PC14PE6 (células de cáncer de pulmón células no pequeñas humana). Los conjugados de H8 humanizado-caliqueamicina y los agentes de control fueron administrados mediante inyección intraperitoneal a los ratones que tenían los tumores en un total de 3 dosis dadas en 4 días de intervalo, es decir, sobre los días 1, 5, y 9 seguido por la selección de los tumores cuando no hubieran logrado el tamaño de aproximadamente 0.08 cm^3 (Figuras 33A-33C, 34A-34C, 35A-35C, y 35E) o en los días 19, 23, y 27 luego de la selección de tumores que habían alcanzado un tamaño de 1.08 cm^3 (Figura 35D). En un estudio, los animales que llevaban los tumores de recaída fueron tratados (Figura 35E). Un total de 11 animales fueron tratados con conjugados de H8 humanizado-caliqueamicina, y 13 animales fueron tratados con las sustancias de control indicadas.

Las ratas de respuesta a la terapia fueron determinadas 99 días después de la primera dosis. La rata de respuesta completa (CR) es el porcentaje de sobrevivencia de ratones con un tamaño de pulmón más pequeño o igual al volumen de tumor inicial promedio del grupo. La rata de respuesta parcial (PR) es el porcentaje de sobrevivencia de ratones con un tamaño de tumor más pequeño o igual a dos veces el volumen de tumor inicial promedio del grupo. La respuesta total (TR) es la suma de CR y PR. Ninguna respuesta (NR) es calculada como (100-TR). Ver las figuras 33C, 34C, y 35C. Los conjugados del H8 humanizado-caliqueamicina inhibieron el crecimiento de todos los tipos de tumor. Ver las figuras 33A-33B, 34A-34B, 35A-35D, y 36A-36B. La cantidad de huH8-AcBut-CalichDMH que se requirió para inhibir las células PC14PE6, es decir, la dosis efectiva mínima es de por lo menos 16 veces menor que la máxima dosis no letal.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado que comprende por lo menos una cadena liviana o por lo menos una cadena pesada, o un fragmento quimérico humanizado de las mismas, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo

(a) liga específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de ligado de por lo menos cerca 1 x 10^{-7} M a cerca de 1 x 10^{-12} M;

(b) liga específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de ligado mayor que 1 x 10^{-11} M;

(c) liga específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de ligado mayor que 5 x 10^{-11} M;

(d) liga específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de ligado mayor que una afinidad de ligado del anticuerpo anti-5T4 de H8 de murina que liga al antígeno 5T4 humano;

(e) objetiva específicamente células que expresan 5T4 in vivo;

(f) compiten en cuanto al ligado al antígeno 5T4 humano con un anticuerpo de cualquiera una de (a)-(e);

(g) liga específicamente a un epitopo ligado por cualquiera uno de (a)-(e); o

(h) comprende un dominio de ligado de antígeno de cualquiera uno de (a)-(e).

2. El anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 que comprende regiones constantes derivadas de regiones constantes humanas.

3. El anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 2, en donde la región constante de cadena liviana humana es derivada de la región constante de cadena liviana kappa humana.

4. El anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 2, en donde la región constante de cadena pesada humana es derivada de de una región constante de cadena pesada de IgG1 humano o de IgG4 humano.

5. El anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 4, la región constante de cadena pesada del IgG1 humano comprende una secuencia de aminoácido de cualquiera una de SEQ ID NOs:25 o 85-89.

6. El anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 4, en donde la región constante de cadena pesada IgG4 humana comprende la prolínea en la posición 241.

7. El anticuerpo anti-5T4 quimérico o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la secuencia de la región variable de cadena liviana comprende los aminoácidos 1-107 de la SEQ ID NO:1.

8. El anticuerpo anti-5T4 quimérico o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la secuencia de

la región variable de cadena pesada comprende los aminoácidos 1-120 de la SEQ ID NO:2.

9. El anticuerpo anti-5T4 quimérico o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la cadena liviana comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:1, y en donde la cadena pesada comprende una región variable que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:2.

10. El anticuerpo anti-5T4 quimérico o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en donde

(a) la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:1, y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:2; o

(b) la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:3, y la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO:4.

11. El anticuerpo anti-5T4 humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la región variable de por lo menos una cadena liviana o por lo menos una cadena pesada comprende:

(a) las regiones de estructura que comprenden los residuos de una región de estructura de anticuerpo humano; y

(b) uno o más CDRs de la región variable de cadena liviana de la SEQ ID NO:17 o uno o más CDRs de la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:18.

12. El anticuerpo anti-5T4 humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 11, en donde la región de estructura comprende:

(a) una región de estructura de cadena liviana del anticuerpo humano de un clon de la línea germinal IV del subgrupo DPK24, o un subgrupo de VκIII, o un clon de la línea germinal del subgrupo VκI;

(b) una región de estructura de la cadena pesada del anticuerpo humano seleccionado entre el grupo que consiste de DP-75, DP-8(VH1-2), DP-25, VI-2b y VI-3(VH1-03), DP-15 y V1-8(VH1-08), DP-14 y V1-18(VH1-18), DP-5 y V1-24P(VH1-24), DP-4(VH1-45), DP-7(VH1-46), DP-10, DA-6 y YAC-7(VH1-69), DP-88(VH1-e), DP-3 y DA-8(VH1-f);

(c) una secuencia de consenso de una región de estructura de cadena pesada de (b); o

(d) una región de estructura que es por lo menos 95% idéntica a una región de estructura de (a)-(c).

13. El anticuerpo anti-5T4 humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 11 que comprende por lo menos dos CDRs de la SEQ ID NOs:17 o 18.

14. El anticuerpo anti-5T4 humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 13, en donde la cadena liviana comprende una región variable que comprende por lo menos dos de tres CDRs de la SEQ ID NO:17.

15. El anticuerpo anti-5T4 humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 14, en donde la cadena liviana comprende una región variable que comprende tres CDRs de la SEQ ID NO:17.

16. El anticuerpo anti-5T4 humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 11, en donde la cadena pesada comprende una región variable que comprende por lo menos dos de tres CDRs de la SEQ ID NO:18.

17. El anticuerpo anti-5T4 humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 16, en donde la cadena pesada comprende una región variable que comprende tres CDRs de la SEQ ID NO:18.

18. El anticuerpo anti-5T4 humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 11, en donde la cadena liviana comprende los CDRs de la SEQ ID NOs:17-18.

19. El anticuerpo anti-5T4 humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la secuencia de la región variable de cadena liviana comprende:

(a) una secuencia de aminoácido de la SEQ ID NO: 17 o 23;

(b) una secuencia de aminoácido que es por los menos 78% idéntica al SEQ ID NO:17; o

(c) una secuencia de aminoácido que es por los menos 81% idéntica al SEQ ID NO:23.

20. El anticuerpo anti-5T4 humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la secuencia de la región variable de cadena liviana es codificada por un ácido nucleico que comprende:

(a) una secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:22 o 81;

(b) una secuencia de nucleótido que es por los menos 90% idéntica al ácido nucleico de la SEQ ID NO:22;

(c) una secuencia de nucleótido que es por los menos 91% idéntica al ácido nucleico de la SEQ ID NO:81; o

(d) un ácido nucleico que hibridiza específicamente al complemento de la SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:81 bajo condiciones de hibridación exigentes.

21. El anticuerpo anti-5T4 humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la secuencia de la región variable de cadena pesada comprende:

(a) una secuencia de aminoácido establecida como cualquiera de las secuencias SEQ ID NOs:18, 19, y 21;

(b) una secuencia de aminoácido que es por los menos 83% idéntica al SEQ ID NO:18;

(c) una secuencia de aminoácido que es por los menos 81% idéntica al SEQ ID NO:19; o

(d) una secuencia de aminoácido que es por los menos 86% idéntica al SEQ ID NO:21.

22. El anticuerpo anti-5T4 humanizado o el fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1, en donde la secuencia de la región variable de cadena pesada esta codificada por un ácido nucleico que comprende:

(a) una secuencia de nucleótido de la SEQ ID NO:20, 82, o 83;

(b) una secuencia de nucleótido que es por los menos 91% idéntica al ácido nucleico de la SEQ ID NO:20 o la SEQ ID NO:83;

(c) una secuencia de nucleótido que es por los menos 94% idéntica al ácido nucleico de la SEQ ID NO:82; o

(d) un ácido nucleico que hibridiza específicamente al complemento de cualquiera una de las SEQ ID NOs:20, 82, y 83 bajo condiciones de hibridación exigentes.

23. Un anticuerpo anti-5T4 humanizado o fragmento de anticuerpo que comprende:

(a) una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:5, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:6; o

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de la SEQ ID NO:5, y una secuencia de aminoácido de la cadena pesada de la SEQ ID NO:6.

24. Un anticuerpo anti-5T4 humanizado o fragmento de anticuerpo que comprende:

(a) una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:7, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:8; o

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de la SEQ ID NO:7, y una secuencia de aminoácido de la cadena pesada de la SEQ ID NO:8.

25. Un anticuerpo anti-5T4 humanizado o fragmento de anticuerpo que comprende:

(a) una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:9, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:10; o

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de la SEQ ID NO:9, y una secuencia de aminoácido de la cadena pesada de la SEQ ID NO:10.

26. Un anticuerpo anti-5T4 humanizado o fragmento de anticuerpo que comprende:

(a) una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:12; o

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de la SEQ ID NO:11, y una secuencia de aminoácido de la cadena pesada de la SEQ ID NO:12.

27. Un anticuerpo anti-5T4 humanizado o fragmento de anticuerpo que comprende:

(a) una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:19; o

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de la SEQ ID NO:11, y una secuencia de aminoácido de la cadena pesada de la SEQ ID NO:84.

28. Un anticuerpo anti-5T4 humanizado o fragmento de anticuerpo que comprende:

(a) una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:8; o

(b) una secuencia de aminoácido de cadena liviana de la SEQ ID NO:11, y una secuencia de aminoácido de la cadena pesada de la SEQ ID NO:8.

29. Un conjugado de anticuerpo/droga para suministrar droga que comprende:

(a) un anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo; y

(b) una droga, que esta indirectamente o indirectamente ligada al anticuerpo o al fragmento del anticuerpo.

30. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 29, en donde el anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo:

(a) liga específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de ligado de por lo menos cerca 1 x 10^{-7} M a cerca de 1 x 10^{-12} M;

(b) liga específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de ligado mayor que 1 x 10^{-11} M;

(c) liga específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de ligado mayor que 5 x 10^{-11} M;

(d) liga específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de ligado mayor que una afinidad de ligado del anticuerpo anti-5T4 de H8 de murina que liga al antígeno 5T4 humano;

(e) objetiva específicamente células que expresan 5T4 in vivo;

(f) compiten en cuanto al ligado al antígeno 5T4 humano con un anticuerpo de cualquiera una de (a)-(e);

(g) liga específicamente a un epitopo ligado por cualquiera uno de (a)-(e); o

(h) comprende un dominio de ligado de antígeno de cualquiera uno de (a)-(e).

31. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 29, en donde el anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:5, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:6; o

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de la SEQ ID NO:5, y una secuencia de aminoácido de la cadena pesada de la SEQ ID NO:6.

00071

32. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 29, en donde el anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:7, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:8; o

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de la SEQ ID NO:7, y una secuencia de aminoácido de la cadena pesada de la SEQ ID NO:8.

33. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 29, en donde el anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:9, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:10; o

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de la SEQ ID NO:9, y una secuencia de aminoácido de la cadena pesada de la SEQ ID NO:10.

34. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 29, en donde el anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:12; o

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de la SEQ ID NO:11, y una secuencia de aminoácido de la cadena pesada de la SEQ ID NO:12.

35. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 29, en donde el anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID NO:19; o

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de la SEQ ID NO:11, y una secuencia de aminoácido de la cadena pesada de la SEQ ID NO:84.

36. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 29, en donde el anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-107 de la SEQ ID NO:11, y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácido de los residuos 1-120 de la SEQ ID NO:8; o

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena liviana de la SEQ ID NO:11, y una secuencia de aminoácido de la cadena pesada de la SEQ ID NO:8.

37. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 29, en donde la droga es un agente terapéutico seleccionado entre el grupo que consiste de una citotoxina, un radioisotopo, un agente inmunomodulatorio, un agente anti-angiogénico, un agente anti-proliferativo, un agente pro-apoptotico, un agente quimioterapeutico, y un ácido nucleico terapéutico.

38. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 37, en donde el agente terapéutico es una citotoxina.

39. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 38, en donde la citotoxina es una antibiótico, un inhibidor de polimerización de tubulina, un agente alquilante, un inhibidor de la síntesis de proteína, un inhibidor de proteína quinaza, un inhibidor de fosfataza, un inhibidor de topoisomerasa, o una enzima.

40. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 39, en donde la citotoxina es un antibiótico.

41. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 40, en donde el antibiótico es caliqueamicina.

42. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 41, en donde la caliqueamicina es un derivado de N-acetilo o un análogo de disulfuro de caliqueamicina.

43. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 42, en donde la caliqueamicina es N-acetilo-γ-caliqueamicina.

44. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 29, en donde la droga esta ligada al anticuerpo mediante un enlazador.

45. El conjugado de anticuerpo/droga de la reivindicación 44, en donde el enlazador es seleccionado entre el grupo que consiste de ácido 4-(4'acetilfenoxi)butanoico (AcBut), ácido 3-acetilfenil acidico (AcPac), ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico (Amida), y sus derivados.

46. Un método para suministrar una droga a células que expresan 5T4 que comprende poner en contacto las células con un conjugado de anticuerpo/droga que comprende (i) un anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo, y (ii) una droga que esta ligada al anticuerpo anti-5T4 humanizado o fragmento de anticuerpo directamente o indirectamente.

47. El método de la reivindicación 46, en donde la droga es internalizada en una célula objetivo.

48. Un método para tratar un sujeto que tiene un cáncer que es positivo en 5T4, dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de anticuerpo anti-5T4/droga que comprende (i) un anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo, y (ii) un agente terapéutico que esta ligado al anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo directamente o indirectamente.

49. El método de la reivindicación 48, en donde el conjugado de anticuerpo anti-5T4/droga es un conjugado de anticuerpo anti-5T4/caliqueamicina, comprende adicionalmente administrar un segundo agente terapéutico, en donde el conjugado anti-5T4/caliqueamicina y el segundo agente terapéutico son administrados concurrentemente o consecutivamente en cualquier orden.

00376
537

RESUMEN

Anticuerpos anti-5T4 humanizados y quiméricos y conjugados de anticuerpo/droga y métodos para preparar y utilizar los mismos.

FIG. 1

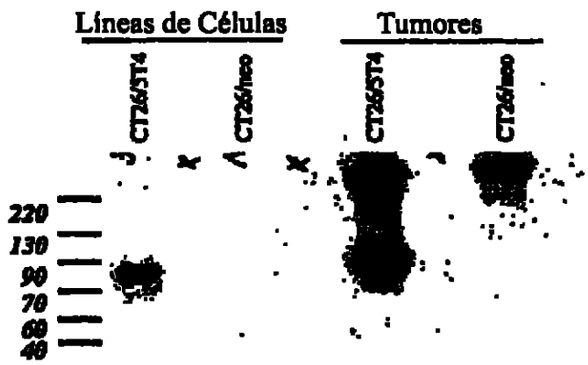

Líneas de Células
Tumores
CT26/ST4
CT26/neo
CT26/ST4
CT26/neo
220
130
90
70
60
40

FIG. 2

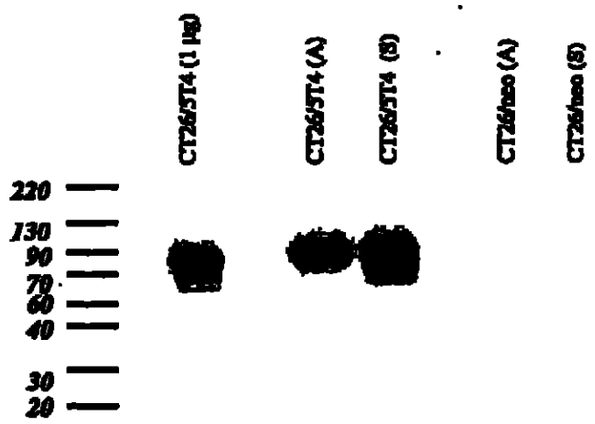

CT26/ST4 (1 µg)
CT26/ST4 (A)
CT26/ST4 (S)
CT26/neo (A)
CT26/neo (S)
220
130
90
70
60
40
30
20

FIG. 3A

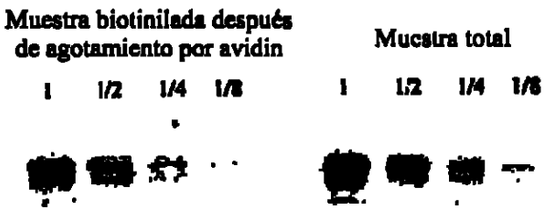

Muestra biotinilada después de agotamiento por avidin
1
1/2
1/4
1/8
Muestra total
1
1/2
1/4
1/8

FIG. 3B

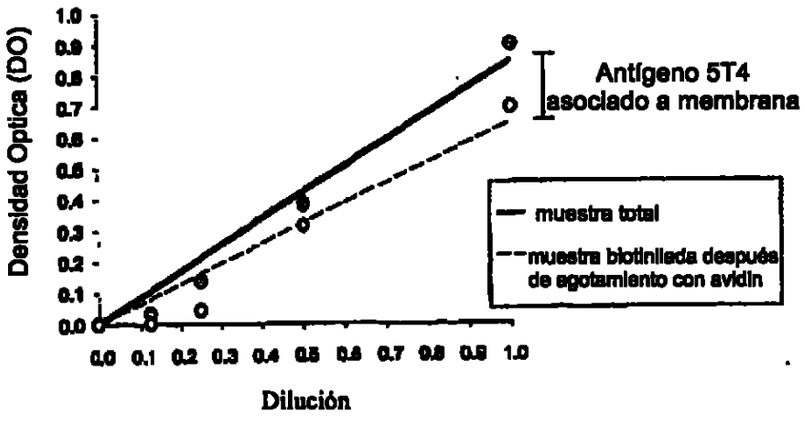

Densidad Optica (DO)
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0.0 0.1 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0
Dilución
Antígeno 5T4 asociado a membrana
muestra total
muestra biotinilada después de agotamiento con avidin

FIG. 4

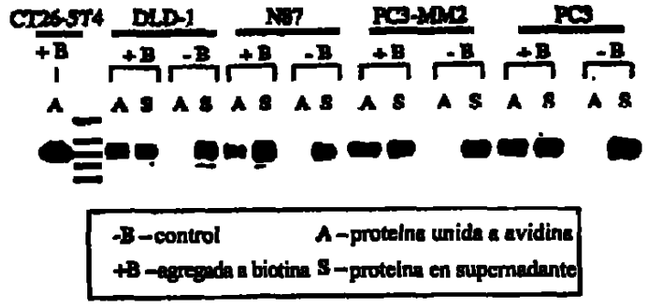

CT26-5T4
DLD-1
N87
PC3-MM2
PC3
+B
-B
A
S
-B –control
+B –agregada a biotina
A –proteína unida a avidina
S –proteína en supernadante

FIG. 5A

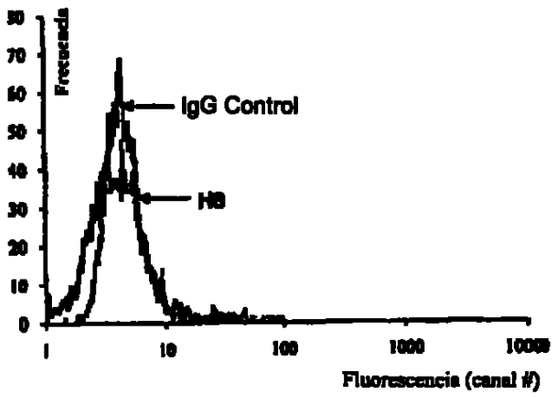

Frecuencia
IgG Control
H8
Fluorescencia (canal #)

FIG. 5B

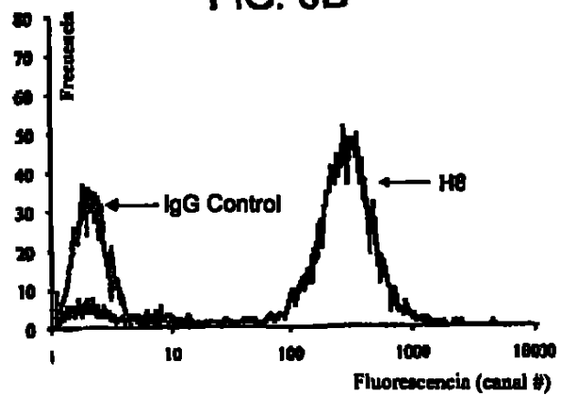
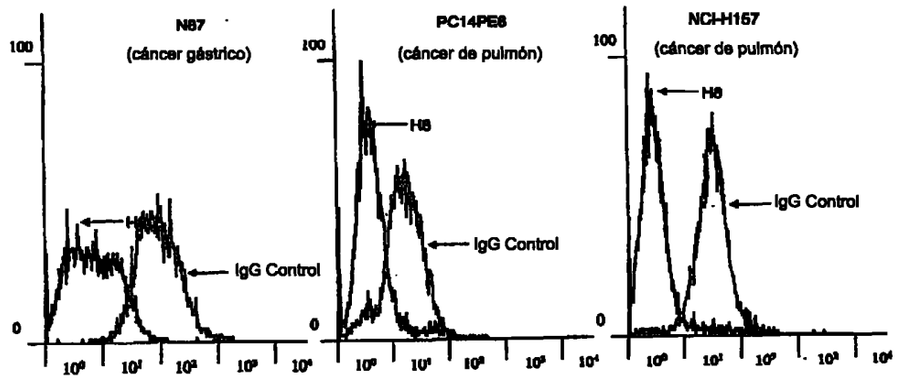

Frecuencia
IgG Control
H8
Fluorescencia (canal #)

FIG. 6



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

FIG. 7

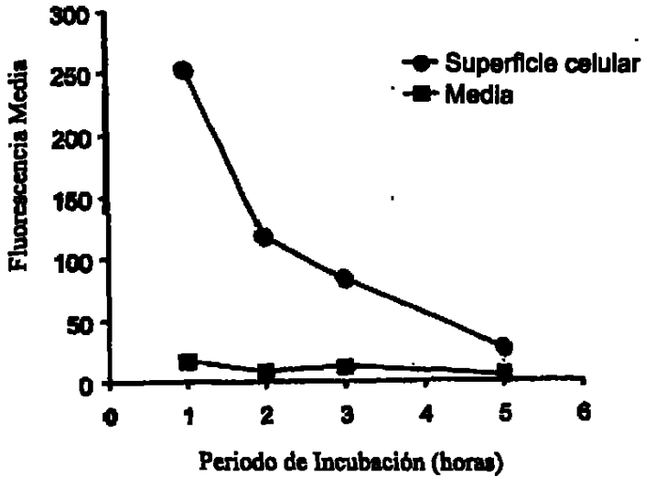

300
250
200
150
100
50
0
Fluorescencia Media
0
1
2
3
4
5
6
Periodo de Incubación (horas)
Superficie celular
Media

FIG. 8

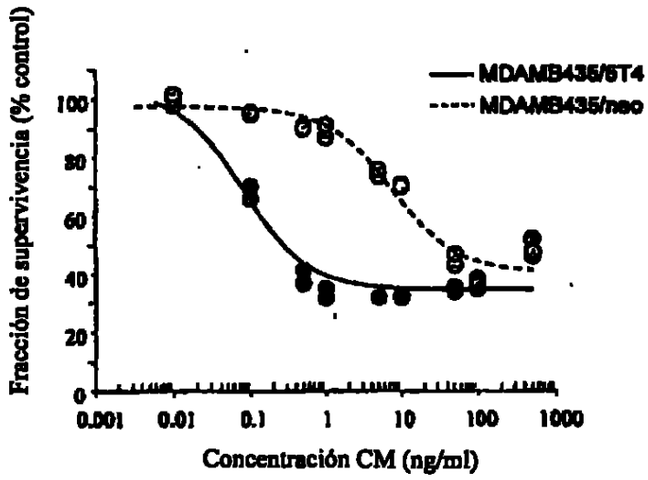

MDAMB435/6T4
MDAMB435/neo
Fracción de supervivencia (% control)
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentración CM (ng/ml)

FIG. 9A

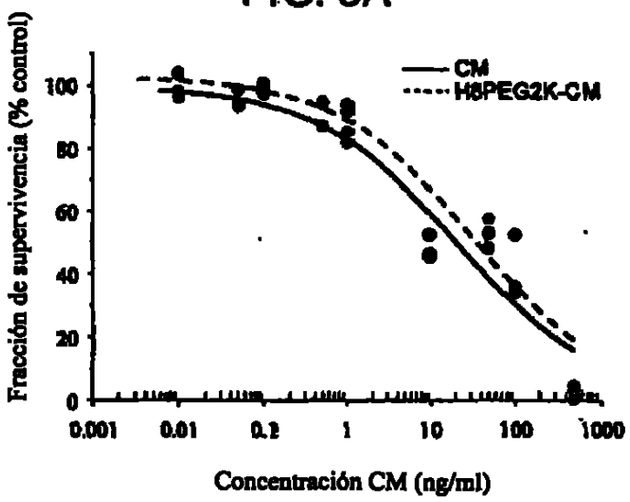

CM
H6PEG2K-CM
Fracción de supervivencia (% control)
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.2
1
10
100
1000
Concentración CM (ng/ml)

FIG. 9B

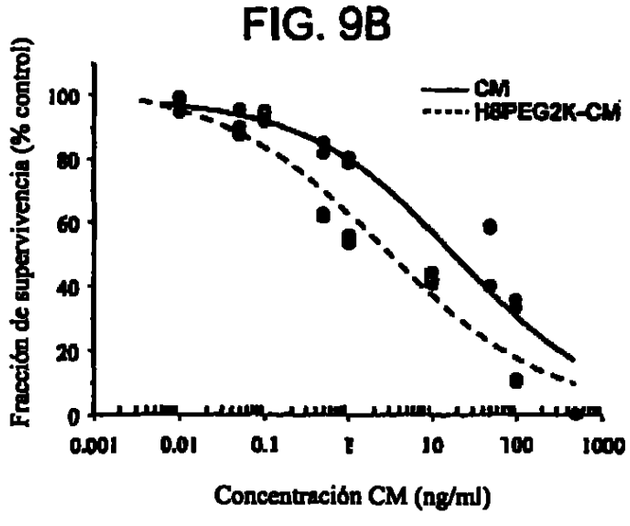

CM
H6PEG2K-CM
Fracción de supervivencia (% control)
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
Concentración CM (ng/ml)

FIG. 10

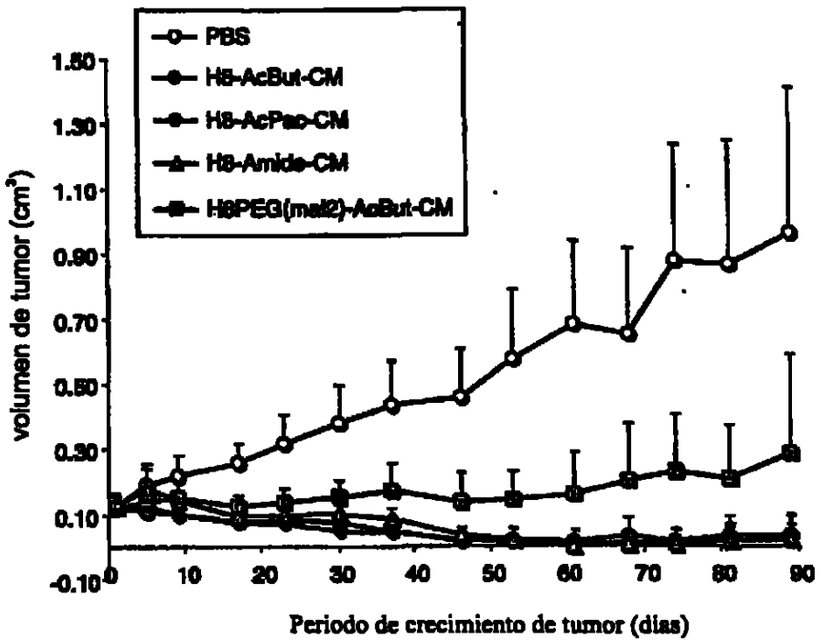

PBS
H5-AcBut-CM
H5-AcPac-CM
H5-Amide-CM
H5PEG(mal2)-AcBut-CM
volumen de tumor (cm³)
1.50
1.30
1.10
0.90
0.70
0.50
0.30
0.10
-0.10
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Periodo de crecimiento de tumor (días)

FIG. 11A

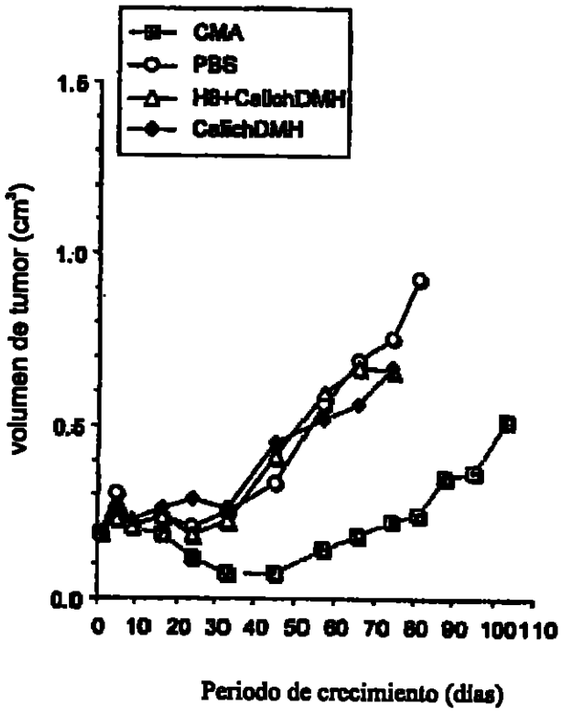

CMA
PBS
HB+CalichDMH
CalichDMH
volumen de tumor (cm³)
1.5
1.0
0.5
0.0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100110
Periodo de crecimiento (días)

FIG. 11B

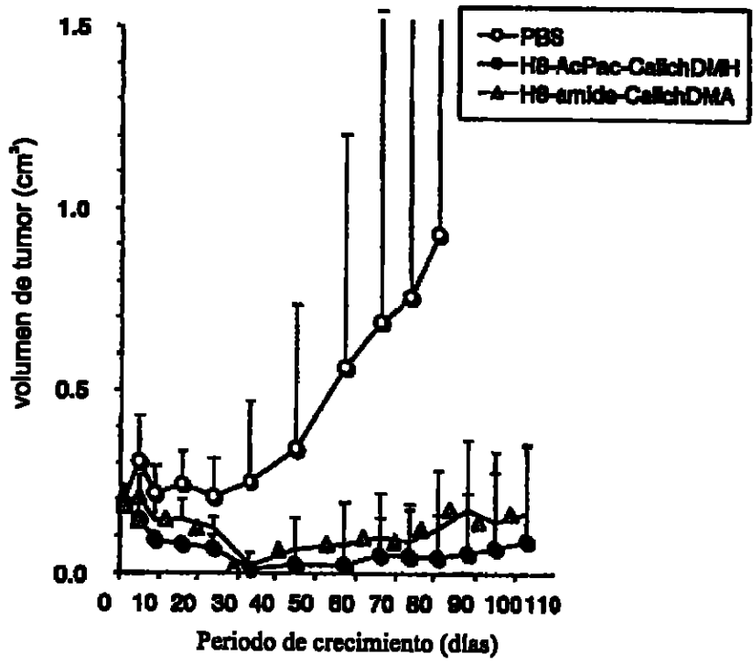

PBS
HS-AcPac-CalichDMH
HS-amide-CalichDMA
volumen de tumor (cm³)
1.5
1.0
0.5
0.0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110
Periodo de crecimiento (días)

FIG. 12

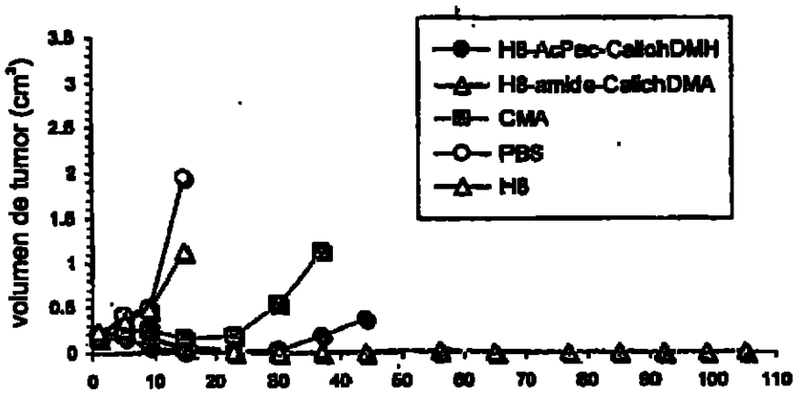

H8-AcPac-CalichDMH
H8-amide-CalichDMA
CMA
PBS
H8
volumen de tumor (cm³)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
Periodo de crecimiento del tumor (días)

FIG. 13A

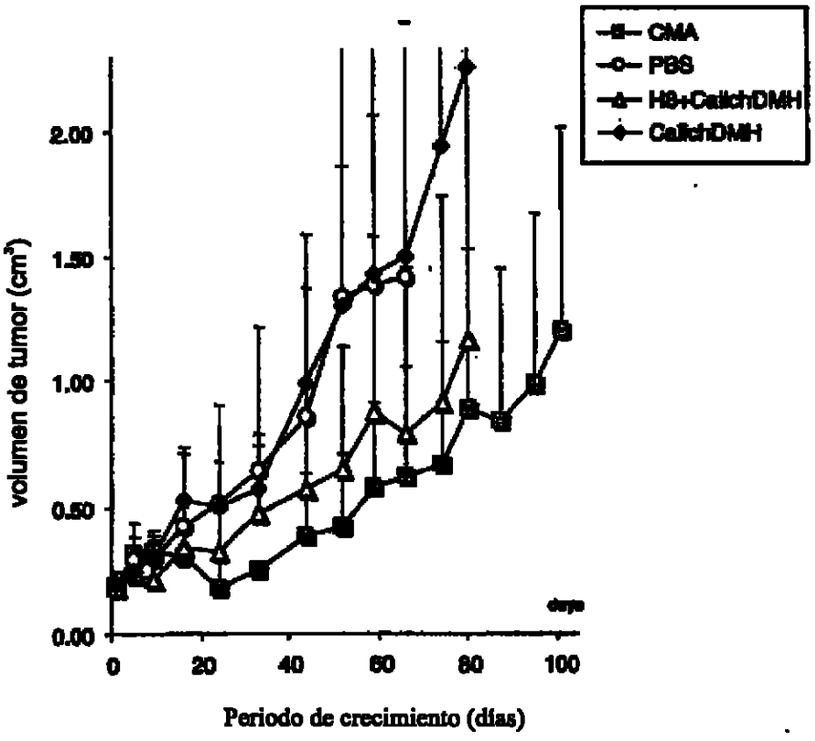

CMA
PBS
H9+CalichDMH
CalichDMH
volumen de tumor (cm³)
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
0
20
40
60
80
100
Periodo de crecimiento (días)

FIG. 13B

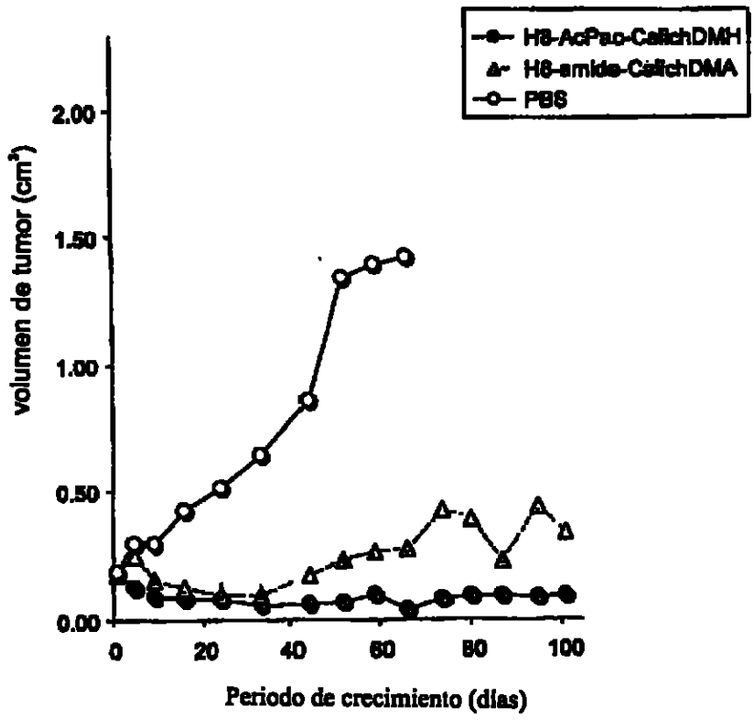
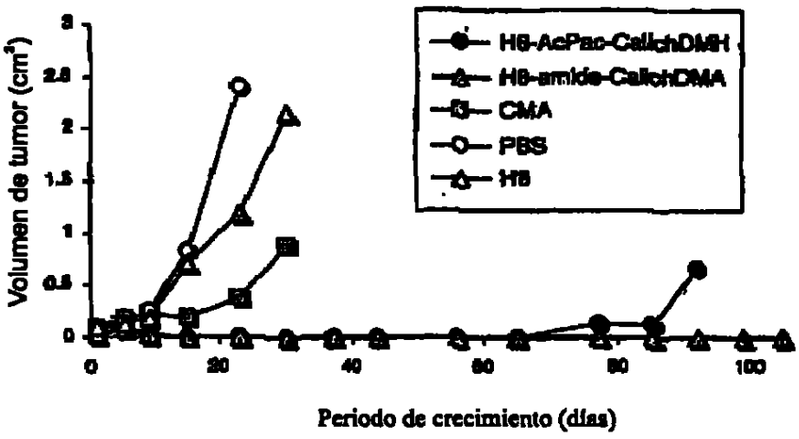

H6-AcPac-CalichDMH
H6-amide-CalichDMA
PBS
volumen de tumor (cm³)
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
0
20
40
60
80
100
Periodo de crecimiento (días)

FIG. 14


HB-AcPac-CalichDMH
HB-amide-CalichDMA
CMA
PBS
HB
Volumen de tumor (cm³)
Periodo de crecimiento (días)

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

FIG. 15A FIG. 15B FIG. 15C

FIG. 15D FIG. 15E FIG. 15F FIG. 15G

FIG. 16

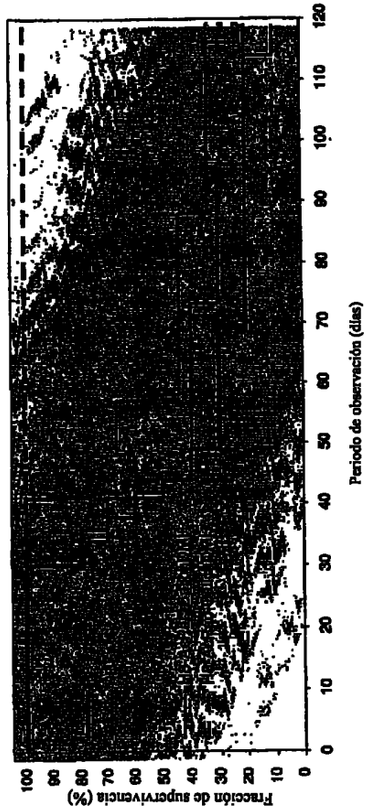

Fracción de supervivencia (%)
100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
Periodo de observación (días)
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120

FIG. 17

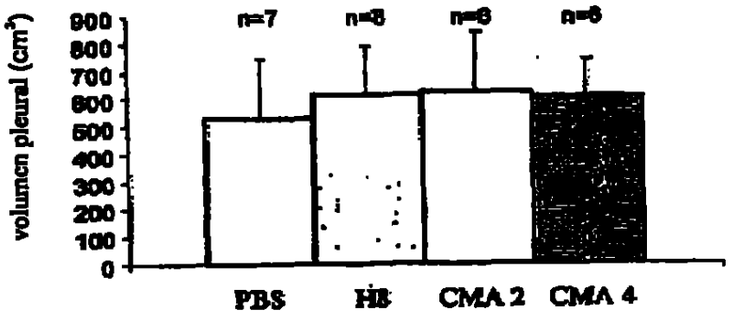
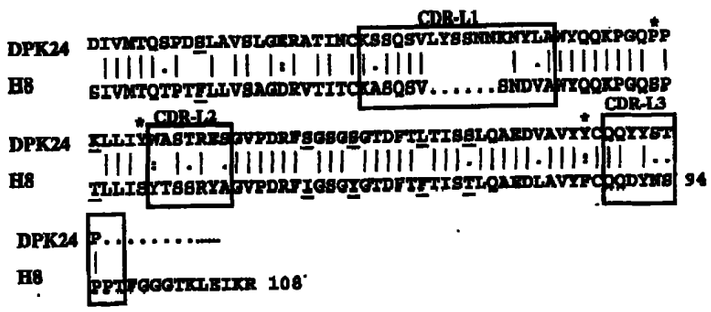

volumen pleural (cm³)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
n=7
n=8
n=6
n=6
PBS
HB
CMA 2
CMA 4

FIG. 18



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

FIG. 19

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

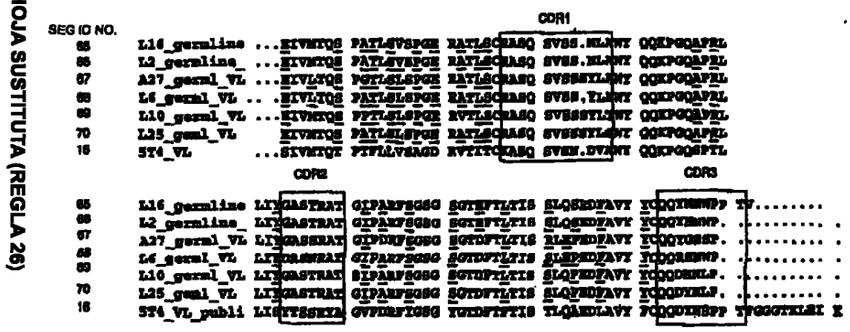


FIG. 20

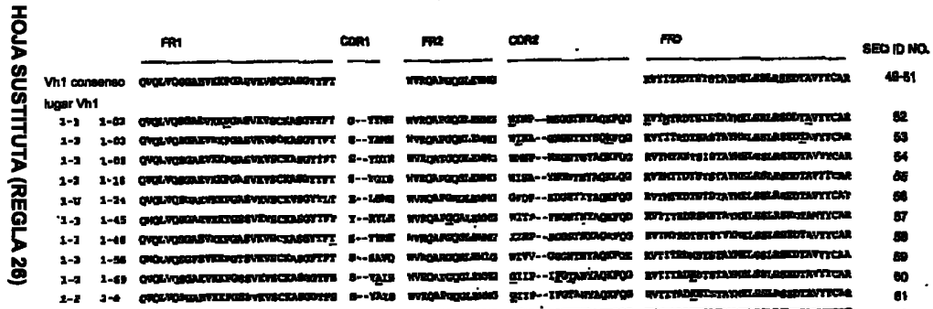
HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

FIG. 21

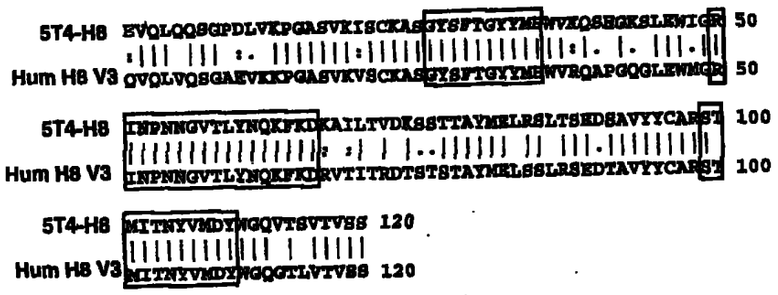
FIG. 22

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)



		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	SEQ ID NO.
Vh1 consenso		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT		WVRQAPGQGLEWMG		RVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	48-61
lugar Vh1							
1-3	1-02	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	G--YTMH	WVRQAPGQR-EWMG	WINP---NSGGTNYAQKFQG	RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR	62
1-3	1-03	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	G--YTMH	WVRQAPGQR-EWMG	WINA---GNGNTKYSQKFQG	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	63
1-3	1-01	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	G--YTIH	WVRQAPGQRLEWMG	WINAGNGNTKYSQKFQG	RVTMTRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	64
1-3	1-18	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	S--YGLS	WVRQAPGQGLEWMG	WISA---NSGNTNYAQKLQG	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	65
1-17	1-24	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLT	E--LSM#	WVRQAPGKGLEWMG	GFDP---EDGETIYAQKFQG	RVTMEEDTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT	66
1-3	1-45	QHQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTFT	Y--RYLH	WVRQAPGQGLEWMG	WITP---FNGNTNYAQKFQD	RVTITRDRSMSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	67
1-1	1-46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	S--YTMH	WVRQAPGQRLEWMG	IINP---SGGSTSYAQKFQG	RVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCAR	68
1-3	1-58	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFT	S--SSVD	WVRQARGQRLEWIG	WIVV---GSGNTNYAQKFQE	RVTITRDMSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAA	69
1-2	1-69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS	S--YAIS	WVRQAPGQGLEWMG	GIIP---IFGTANYAQKFQG	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR	60
1-2	1-0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFT	S--YAIH	WVRQAPGQRLEWMG	GIIP---IFGTANYAQKFQG	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCAR	61
1-2	1-f	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFT	D--TIHW	WVQQAPGKGLEWMG	LVDP---EDGETIYAEKFQG	RVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCMT	62

FIG. 23



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

FIG. 24A

VL versión 1 H8 anti-5T4 Humanizado (secuencia de nucleotido) (SEQ ID NO:81)

GATATTGTGATGACCCAGTCCCCCGACTCCCTGGCCGTTTCACTGGGAGAGAGGGCC
ACCATAAACTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAACAG
AAGCCAGGGCAGTCCCCTAAGCTGCTCATATCCTATACATCCAGTCGCTACGCTGGA
GTCCCTGATCGCTTCTCCGGCAGTGGATCCGGGACCGATTTCACTCTGACCATCAGC
TCCTTGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTTCTGTCAGCAAGATTATAATTCTCCT
CCCACCTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

. VL versión 1 H8 anti-5T4 Humanizado (secuencia de proteina) (SEQ ID NO:71)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLISYTSSRYAG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIK

H8 anti-5T4 Humanizado versión 2 VL (secuencia de acido nucleotido) (SEQ ID NO:22)

GATATTGTGATGACCCAGTCCCCCGACTCCCTGGCCGTTTCACTGGGAGAGAGGGCC
ACCATAAACTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAACAG
AAGCCAGGGCAGCCCCCTAAGCTGCTCATATACTATACATCCAGTCGCTACGCTGGA
GTCCCTGATCGCTTCTCCGGCAGTGGATCCGGGACCGATTTCACTCTGACCATCAGC
TCCTTGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAAGATTATAATTCTCCT
CCCACCTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

H8 anti-5T4 Humanizado versión 2 VL (secuencia de proteina) (SEQ ID NO:23)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQPPKLLIYYTSSRYAG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGGGTKLEIK

FIG. 24B

VH versión 1 anti-5T4 H8 humanizado (secuencia de nucleótido) (SEQ ID NO:82)

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACTACATGCACTGGGTGAAG
CAGAGCCCCGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGACGTATTAATCCTAACAATGGTGTT
ACTCTCTACAACCAGAAATTCAAGGACCGCGTGACCATGACTCGCGACACCTCCATC
TCCACAGCCTACATGGAGCTCTCCCGCCTGCGCTCTGACGACACCGCCGTCTATTAC
TGTGCACGCTCCACTATGATTACCAACTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGCACC
CTGGTCACCGTCTCCTCA

VH versión 1 anti-5T4 H8 humanizado (secuencia de proteína) (SEQ ID NO:18)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVKQSPGQGLEWIGRINPFNGV
TLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGT
LVTVSS

VH versión 2 anti-5T4 H8 humanizado (secuencia de nucleótido) (SEQ ID NO:20)

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACTACATGCACTGGGTGCGC
CAGGCCCCCGGACAGGGCCTTGAGTGGATGGGACGTATTAATCCTAACAATGGTGTT
ACTCTCTACAACCAGAAATTCAAGGACCGCGTGACCATGACTCGCGACACCTCCATC
TCCACAGCCTACATGGAGCTCTCCCGCCTGCGCTCTGACGACACCGCCGTCTATTAC
TGTGCACGCTCCACTATGATTACCAACTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGCACC
CTGGTCACCGTCTCCTCA

VH versión 2 anti-5T4 H8 humanizado (secuencia de proteína) (SEQ ID NO:21)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPFNGV
TLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGT
LVTVSS

FIG. 24C

VH consensus H8 anti-5T4 (versión 3) (secuencias de nucleótio) (SEQ UD NO:83)

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACTACATGCACTGGGTGCGC
CAGGCCCCCGGACAGGGCCTTGAGTGGATGGGACGTATTAATCCTAACAATGGTGTT
ACTCTCTACAACCAGAAATTCAAGGACCGCGTGACCATCACTCGCGACACCTCCACC
TCCACAGCCTACATGGAGCTCTCCTCCCTGCGCTCTGAGGACACCGCCGTCTATTAC
TGTGCACGCTCCACTATGATTACCAACTATGTTATGGACTACTGGGGTCAAGGCACC
CTGGTCACCGTCTCCTCA

VH consensus H8 anti-5T4 (secuencia de proteína) (versión 3) (SEQ ID NO:19)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNNGV
TLYNQKFKDRVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTHITNYVMDYWGQGT
LVTVSS

FIG. 25A

BLASTP 2.2.9 [May-01-2004]

Referencia:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1089081363-11636-133239623050.BLASTQ1

Consulta=

(107 documentos)

Base de datos: todas las traducciones de +PDB+SwissProt+PIR+PRF que excluye muestras ambientales de CDS GenBank no redundante
1,866,121 secuencias; 619,474,291 total de documentos

Si usted tiene cualquier problema o preguntas con los resultados de esta búsqueda por favor refierase al BLAST FAQs

Reportes Taxonómicos

Estructuras Relacionadas

Alineamiento significativo que produce secuencias	Clasificación (Bits)	Valor E
gi|229828|prf|1701423A proteina Len, Bence-Jones	183	1e-45
gi|28848871|gb|AAO47762.1| cadena liviana kappa de inmunoglobulina	181	1e-40
gi|15895329|emb|CAC82418.1| [Mus cadena kappa de inmunoglobulina	161	3e-40
gi|52181|emb|CAA25865.1| [Músculo Mus] cadena precursora-L(K)	164	4e-40
gi|21669428|dbj|BAC91729.1| cadena liviana kappa de inmunoglobulina	164	4e-40
gi|1336702|gb|AAB35975.1| Li Ig E apolipoproteina anti-humana	164	4e-40
gi|4468|gb|AAA52143.1| inmunoglobulina integrina 4 anti-alfa	164	5e-40
gi|125934|sp|P06314|KVJC B REGIÓN V-IV DE CADENA KAPPA IG HUMANA	164	5e-40
gi|90847|pir||S04577 región V de precursor de cadena kappa Ig (MRL	164	5e-40
gi|29078113|gb|AAC01941.1| cadena liviana kappa de anticuerpo monoclonal	164	6e-40

Alineamientos

>gi|28848874|gb|AAO47762.1| [Homo sapiens] región VKJ cadena liviana kappa de inmunoglobulina
Longitud = 133

Clasificación= 166 bits (419), Esperado= 1e-40
Identidades = 91/113 (80%), Positivos = 99/113 (87%), Espacios= 6/113 (5%)

Consulta: 3 D[illegible] 54
Sujeto: 21 [illegible] 80

Consulta: 55 [illegible] 107
Sujeto: 81 [illegible] 133

FIG. 25B

BLASTP 2.2.9 [May-01-2004]

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1095082880-19567-140480776873.BLASTQ4

Consulta=
(120 documentos)

Base de datos: todas las traducciones de +PDB+SwissProt+PIR+PRF que excluye muestras ambientales de CDS GenBank no redundante
1,866,121 secuencias; 619,474, total de documentos

Si usted tiene cualquier problema o preguntas con los resultados de esta búsqueda por favor refierase al BLAST FAQs

Reportes Taxonómicos

Alineamiento significativo que produce secuencias

		Clasificación (bits)	E Valor
gi|11616791|gb|AAA16897.1|	VH cadena pesada de IgM inmunoglobulin	191	3e-48
gi|2591408|gb|AAB70129.1|	Re variable de cadena pesada de anticuerpo	189	1e-47
gi|1083642|gb|AAD09415.1|	variable de cadena pesada de inmunoglobulina	188	3e-47
gi|31712|emb|CAA78394.1|	variable de cadena pesada de inmunoglobulina	188	3e-47
gi|3927|gb|AAA17973.1|	variable de cadena pesada de inmunoglobulina	188	3e-47
gi|21669997|gb|AAC02305.1|	VHDJ de cadena pesada de inmunoglobulina	188	3e-47
gi|44555644|emb|CAD97164.1|	variable de cadena pesada de inmunoglobulina	188	3e-47
gi|19848552|gb|AAL17992.1|	variable de cadena pesada de inmunoglobulina	187	6e-47
gi|21670205|gb|AAC02310.1|	VHDJ de cadena pesada de inmunoglobulina	186	8e-47
gi|3927|gb|AAA17848.1|	variable de cadena pesada de inmunoglobulina	186	1e-46

Alineamiento

>gi|116:6791|gb|AAA16897.1| [Homo sapiens] región VHIde cadena pesada IgM Inmunoglobulina

Longitud = 139

Clasificación = 191 bits (486), Esperado = 3e-48
Identidades = 100/123 (82%), Positives = 109/121 (90%) Espacios = 1/121 (0%)

```
: 1   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNY 60
      QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNY
: 1   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNY 60

: 61  AQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARESWLVLEHYFDYWGQGTLVTVS 120
       Q+F+ RVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCAR  +L  + DYWGQGTLVTVS
: 61  QQFEDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDMSLVLEHYFDYWGQGTLVTVS 120

: 120 S 123
        S
  121 S 121
```

FIG. 25C

BLASTP 2.2.9 [May-01-2004]

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1038084353-21919-24181.327241.BLASTQ4

Consulta=

(120 documentos)

Base de datos: todas las traducciones de +PDB+SwissProt+PIR+PRF que excluye muestras ambientales de CDS GenBank no redundante
1,866,121 secuencias; 619,474,291 total de documentos

Si usted tiene cualquier problema o preguntas con los resultados de esta búsqueda por favor refierase al **BLAST FAQs**

Reportes Taxonómicos

Alineamiento significativo que produce secuencias	Clasificación (bits)	E. Valor
gi|1161791|gb|AAB16897.1| VH cadena pesada de IgM inmunoglobulina	195	2e-49
gi|25808406|gb|AAN76529.1| Re variable de cadena pesada de anticuerpo	192	1e-48
gi|21689957|dbj|BAC02008.1| VHDJ cadena pesada de inmunoglobulina	191	3e-48
gi|392715|gb|AAA17973.1| Variable de cadena pesada de inmunoglobulina	191	3e-48
gi|317243|gb|AAC18354.1| Variable de cadena pesada de inmunoglobulina	191	3e-48
gi|445656|emb|CAA57766.1| Variable de cadena pesada de inmunoglobulina	191	4e-48
gi|1808352|gb|AAL17962.1| Variable de cadena pesada de inmunoglobulina	191	5e-48
gi|21670201|dbj|BAC02210.1| VHDJ cadena pesada de inmunoglobulina	190	6e-48
gi|392742|gb|AAA17848.1| Variable de cadena pesada de inmunoglobulina	190	7e-48
gi|4826342|gb|AAD30415.1| Variable de cadena pesada de inmunoglobulina	190	7e-48

Alineamiento

>gi|1161791|gb|AAB16897.1| [Homo sapiens] región Vhlde cadena pesada IgM

Longitud = 139

Clasificación= 195 bits (496), Esperado= 2e-49
Identidades = 103/121 (85%), Positivos = 109/121 (90%), Espacios= 1/121 (0%)

```
Consulta:  1   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWVTLY 60
               QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY+FTGYYIHWVRQAPGQGLEWMG I+PN+G T Y
Sujeto:    1   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQGLEWMGIINPNGGSTSY 60

Consulta:  61  AQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGY-WYFNLVWDYWGQGTLVTVS 119
               A KF+ RVTMTRDTSIS+AYMELSKLRSDDTAVYYCAR   ++  + DYWGQGTLVTVS
Sujeto:    61  ANKFEARVTMTRDTSISSAYMELSKLRSDDTAVYYCARSGWLVLEHYFDYWGQGTLVTVS 120

Consulta:  120 S 120
               S
Sujeto:    121 S 120
```

FIG. 25D

BLASTP 2.2.9 [May-01-2004]

Altschul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1088085285-29969-58693772539.BLASTQ4

Consulta=

(107 documentos)

Base de datos: todas las traducciones de +PDB+SwissProt+PIR+PRF que excluye muestras ambientales de CDS GenBank no redundante
1,866,121 secuencias; 619,474,291 total de documentos

Si usted tiene cualquier problema o preguntas con los resultados de esta búsqueda por favor refierase al BLAST FAQs

Reportes Taxonómicos

Alineamiento significativo que produce secuencias	Clasificación (bits)	E Valor
gi|229528|prf||751423A proteina Len, Bence-Jones	191	3e-49
gi|28948974|gb|AAO47762.1| cadena liviana kappa de inmunoglobulina	173	1e-42
gi|21669429|gb|AAC01739.1| cadena liviana kappa de inmunoglobulina	172	2e-42
gi|125834|sp|P06314|KV4C B REGIÓN V-IV DE CADENA KAPPA IG	171	3e-42
gi|598166|gb|AAA72132.1| cadena liviana kappa de inmunoglobulina	171	4e-42
gi|125833|pp|P06313|KV4B J REGIÓN V-IV DE CADENA KAPPA IG	170	6e-42
gi|185921|gb|AAA59014.1|Precursor de región V-J1 de cadena KAPPA IG	170	9e-42
gi|69765|pir||K4BG17 Ig Región V-IV precursor de cadena Kappa	169	1e-41
gi|54372|gb|AAB52411.1| (H dominio variable de cadena liviana Ig	169	1e-41
gi|251240|gb|ALB24404.1| Reg V cadena liviana M de inmunoglobulina	169	1e-41

Alineamiento

>gi|229528|prf||751423A proteina Len, Bence-Jones
= 220

Clasificación = 191 bits (486), Esperado = 3e-49
Identidades = 91/113 (80%), Positivos = 100/113 (88%), Espacios = 6/113 (5%)

```
Consulta: 1   DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSV------SNDVAWYQQKPGQPPKLLIYYTSSR 54
              DIVMTQSP+SLAVSLGERATINCK+SQSV      N +AWYQQKPGQP KLLIY+ S+R
Sujeto: 1     DIVMTQSPNSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNSRNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR 60

Consulta: 55  YAGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQQYYSTPYTFGQGTKLEIK 107
              +GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQ Y++P +FG GTK+EIK
Sujeto: 61    HGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPYSFGQGTKLEIK 113
```

FIG. 25E

BLASTP 2.2.9 [May-01-2004]

Referencia:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1088083751-3503-152757984240.BLASTQ4

Consulta =

(120 documentos)

Base de datos: todas las traducciones de +PDB+SwissProt+PIR+PRF que excluye muestras ambientales de CDS GenBank no redundante
1,866,121 secuencias; 619,474,291 total de documentos

Si usted tiene cualquier problema o preguntas con los resultados de esta búsqueda por favor refierase al **BLAST FAQs**

Reportes Taxonómicos

Estructura relacionales

Alineamiento significativo que produce secuencias	Clasificación (bits)	E Valor
gi|17939658|gb|AAH19337.1| [Homo sapiens] proteina IGHG1	187	5e-47
gi|1616791|gb|AAB16857.1| VH cadena pesada IgM de inmunoglobulina	186	1e-46
gi|46254150|gb|AAS86045.1| [Homo cadena pesada de inmunoglobulina	184	5e-46
gi|25988406|gb|AAN76129.1| re variable de cadena pesada de anticuerpo	184	5e-46
gi|2344918|gb|AAC51689.1| precur región VH1 de cadena pesada IgM	184	6e-46
gi|619758|gb|AAA60338.1|M anticuerpo de cadena mu de inmunoglobulina	183	7e-46
gi|486871|pir||S36265 (Clon alfa- región V cadena pesada Ig	183	8e-46
gi|2344948|gb|AAC51704.1| Precur región VH1 de cadena pesada IgM	183	1e-45
gi|44456564|emb|CAB37164.1|Varia cadena pesada de inmunoglobulina	183	1e-45
gi|185698|gb|AAA58814.1| Cadena pesada de inmunoglobulina	182	1e-45

Alineamiento

>gi|17939658|gb|AAH19337.1| [Homo sapiens] proteina IGHG1
Longitud = 466

Clasificación = 187 bits (476), **Esperado =** 5e-47
Identidades = 97/120 (80%), **Positivos =** 102/120 (85%), **Espacios =** 5/120 (4%)

```
Consulta : 1   QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNSGVTLY 60
           QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGY+FT YYMHWVRQAPGQGLEWMG INP+ G T Y
Sujeto : 20  QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMHWVRQAPGQGLEWMGIINPSGGSTDY 79

Consulta : 61  NQKFKDRVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTNITNYVMDYWGQGTLVTVSS 120
             Q F+ RVT+TRDTSTST YMEL+SLRSEDTAVYYCAR        V DYWGQGT VTVSS
Sujeto : 80  AQMFQGRVTMTRDTSTSTVYMELTSLRSEDTAVYYCARIG-----VHDYWGQGTQVTVSS 134
```

FIG. 25F

BLASTN 2.2.9 [May-01-2004]

Referencia:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1088085478-1302-167097446066.BLASTQ4

Consulta =

(360 Documentos)

Base de datos: todas las secuencias GenBan+EMBL+DDBJ+PDB (Pero no EST, STS, GSS, muestras ambientales o secuencias HTGS de fase 0, 1, o 2)
2,232,679 secuencias; 10,785,813,082 total de documentos

Si usted tiene cualquier problema o preguntas con los resultados de esta búsqueda por favor refierase al **BLAST FAQs**

Reportes Taxonómicos

Alineamiento significativo que produce secuencias	Clasificación (bits)	E Valor
gi|47109385|emb|AJ704536.1| Anti-PL constructor sintético	200	1e-48
gi|25988405|gb|AF453216.1| R-03VH clon constructor sintético	192	3e-46
gi|11875739|gb|AF302820.1|AF302820 163 aislado de Homo sapiens	192	3e-46
gi|3170764|gb|AF062151.1|AF062151 45u-26 clon de Homo sapiens	192	3e-46
gi|3170748|gb|AF062143.1|AF062143 45u-26 clon de Homo sapiens	192	3e-46
gi|557922|gb|S71521.1|S71521 { somati cadena pesada VH1-IgM de I	192	3e-46
gi|33104|emb|X07448.1|HSIGHV35 Pesado Ig para gen V35 Humano	192	3e-46
gi|587288|emb|Z37312.1|HSIGVHC24 Inmun redispuesto H. Sapiens	192	3e-46
gi|10697073|emb|AJ406653.2|HSA406653 v parcial Homo sapiens	192	3e-46
gi|15886969|emb|AJ414014.1|HSA414014 m parcial Homo sapiens	192	3e-46

FIG. 25G

Alineamiento

>gi|47109389|emb|AJ704936.1| Anticuerpo, ScFv anti-PLAP para construcción sintética clon 6LC4
Longitud = 732

Clasificación = 200 bits (101), Esperado = 1e-48
Identidades = 146/161 (90%)
Hélice = Más / Más

Consulta: 1 caggtccagctggtgcagtctggagccgaggtgaagaagcctgggqcttcagtgaaggtg 60
Sujeto: 1 caggtgcagctggtgcagtctgggqctgaggtgaagaagcctggggcttcagtgaaagtc 60

Consulta: 61 tcctgcaaggcttctggttactcattcaccggctacaatgccatgggtgcgccaggcc 120
Sujeto: 61 tcctgcaaggcttctggatacaccttcaccggctacaatgccatgggtgcgccaggcc 120

Consulta: 121 ccccggacagggccttgagtggatgggacgtattaatcctaa 161
Sujeto: 121 cctggacaagggcttgagtggatgggatggattaatcctaa 161

Clasificación = 42.1 bits (21), Esperado = 0.76
Identidades = 51/61 (83%)
Hélice = Plus / Plus

Consulta: 231 cacagcctacatggagctctccagcctgcgctctgacgacacggccgtctattactgtgc 290
Sujeto: 231 cacagaatacacaggagctgagcagcctgcggatctgaggacacggccgtgtattactgtgc 290

Consulta: 291 a 291
Sujeto: 291 a 291

FIG. 25H

BLASTN 2.2.9 [May-01-2004]

Referencia :
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1088085738-6717-83306962642.BLASTQ4

Consulta =

(321 Documentos)

Base de datos: todas las secuencias GenBan+EMBL+DDBJ+PDB (Pero no EST, STS, GSS, muestras ambientales o secuencias HTGS de fase 0, 1, o 2)
2,232,679 secuencias ;10,785,813,082 total de documentos

Si usted tiene cualquier problema o preguntas con los resultados de esta búsqueda por favor refierase al

Reportes Taxonómicos

Alineamiento significativo que produce secuencias:	Clasificación (bits)	E Valor
gi|7769338|gb|AF206032.1|AF206032 16 hibridoma de músculo mus	309	2e-81
gi|197464|gb|M14360.1|MUSIGKVH Cadena-Kappa linea germinal Ig de raton	280	2e-72
gi|5327158|emb|AJ235968.1|MMU235968 19-32 IgVk músculo mus	272	4e-70
gi|804922|dbj|D90385.1|MUSIKCVRJ Inmu para mRNA músculo M.	270	2e-69
gi|406294|emb|X70424.1|MMIGLGKA Monoclo para mRNA musculo M.	270	2e-69
gi|1020158|gb|U30233.1|MMU30233 Antib anti-ADN musculo Mus	269	6e-69
gi|1870335|gb|U55610.1|MMU55610 Inmu anti-ADN musculo Mus	266	2e-68
gi|1419647|emb|Z75765.1|MMZ75765 Inmunoglobulina mRNA músculo M.	264	1e-67
gi|235116|gb|S60946.1|S60946 Región Kappa V BA.N4:4.57 mAb	264	1e-67
gi|474312|dbj|D29771.1|MUSVRIKCB Inmu para mRNA músculo M.	262	4e-67

FIG. 25I

Alineaciones

>gi|7769338|gb|AF206032.1|AF206032 MRNA región bariable de cadena liviana de inmunoglobulina anti-miosina 16B2-A1 hibridoma de Mus músculo
Consulta = 297

Clasificación = 309 bits (156),Esperado= 2e-81
Identidades = 237/264 (89%)
Hélice = Más / Más

```
Consulta: 58  acaataaactgcaaggccagtcagagtgtgagtaatgatgtggcttggtaccaacagaag 117
              ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sujeto: 34    accataacctgcaaggccagtcagagtgtgagtaatgatgtagcttggtaccaacagaag 93

Consulta: 118 ccagggcagccctaagtctgctatatactatgcatccaagtcgctacgctggagtccct 177
              |||||||||| | ||||| ||||| ||||||||| |||||| ||||||| ||||||||||
Sujeto: 94    ccagggcagtctcctaaactgctgatatactatgcatccaatcgctacactggagtccct 153

Consulta: 178 gatcgcttcatccggcagtggatccgggaccgatttcactctgaccatcagctccttgcag 237
              ||||||||| | |||||||||| ||||| ||||||||| | ||||||||| | |||||
Sujeto: 154   gatcgcttcactggcagtggatatgggacgggatttcactttcaccatcagcactgtgcag 213

Consulta: 238 gctgaagacgtggcagtttattactgtcagcaagattataattctcctccacgttcggt 297
              ||||||||| |||||||||||| ||||||||| ||||||| |||||| || ||||||
Sujeto: 214   gctgaagacctggcagtttatttctgtcagcaggattatagctctcctcggacgttcggt 273

Consulta: 298 ggaggcaccaagctggaaatcaaa 321
              ||||||||||||||||||||||||
Sujeto: 274   ggaggcaccaagctggaaatcaaa 297
```

FIG. 25J

BLASTN 2.2.9 [May-01-2004]

Referencia :
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1093542606-6137-11627181607.BLASTQ4

Consulta =

(321 Documentos)

Base de datos: todas las secuencias GenBan+EMBL+DDBJ+PDB (Pero no EST, STS, GSS, muestras ambientales o secuencias HTGS de fase 0, 1, o 2)
2,568,353 secuencias ;11,601,399,943 total de documentos

Si usted tiene cualquier problema o preguntas con los resultados de esta búsqueda por favor refierase al BLAST FAQs

Reportes Taxonómicos

Alineamiento significativo que produce secuencias:	Clasificación (bits)	E Valor
gi|7769338|gb|AF206032.1|AF206032 16 hidroma muscular Mus	317	8e-84
gi|197464|gb|M14360.1|MUSIGKVM Cadena-Kappa linea germinal Ig de raton	287	7e-75
gi|50300047|gb|AY591620.1| Inmu IgK19-32 clon músculo Mus	280	2e-72
gi|5327158|emb|AJ235968.1|MMU235968 19-32 IgVk músculo Mus	280	2e-72
gi|804922|dbj|D50385.1|MUSIECVRJ Inmun para mRNA músculo Mus	278	7e-72
gi|496254|emb|X70424.1|MMTGLCKA Monoclo para mRNA musculo M.	278	7e-72
gi|1020158|gb|U30233.1|MMU30233 Anticuerpo anti-ADN músculo Mus	276	3e-71
gi|1070335|gb|U55610.1|MMU55610 Anticuerpo anti-ADN músculo Mus	274	1e-70
gi|1419647|emb|Z75765.1|MME75765 Inmunoglobulina mRNA músculo M.	272	4e-70
gi|238116|gb|S60946.1|S60946 Región Kappa V BA.N4:4.57 mAb	272	4e-70

FIG. 25K

Alineaciones

>gi|7769338|gb|AF206032.1|AF206032 MRNA región bariable de cadena liviana de inmunoglobulina anti-miosina 16B2-A1 hibridoma de Mus músculo

Consulta = 297

Clasificación = 317 bits (160) Esperado = 8e-84
Identidades = 238/264 (90%)
Hélice = Más /Más

```
Consulta:  58  accatcaactgcaaggccagtcagagtgtgagtaatgatgtggcttggtaccaacagaag 117
               ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sujeto:    34  accataacctgcaaggccagtcagagtgtgagtaatgatgtagcttggtaccaacagaag 93

Consulta:  118 ccagggcagtcccctaagctgctcatatgctatacatccagtcgctacgctggagtccct 177
               |||||||||||| ||||| ||||| |||| |||| |||||| ||||||| ||||||||||
Sujeto:    94  ccagggcagtctcctaaactgctgatatactatgcatccaatcgctacactggagtccct 153

Consulta:  178 gatcgcttctccggcagtggatccgggacagatttcactctgaccatcagctccttgcag 237
               ||||||||| |·|||||||||| ||||| |||||||||| | |||||||||  |  |||||
Sujeto:    154 gatcgcttcaatggcagtggatatgggacggatttcactttcaccatcagcactgtgcag 213

Consulta:  238 gctgaagacgtggcagtttatttctgtcagcaagattataattatcctccgacgttcggt 297
               ||||||||| |||||||||||||||||||||| ||||||| ||||||| || ||||||
Sujeto:    214 gctgaagacctggcagtttatttctgtcagcaggattatagctatcctcggacgttcggt 273

Consulta:  298 ggaggcaccaagctggaaatcaaa 321
               ||||||||||||||||||||||||
Sujeto:    274 ggaggcaccaagctggaaatcaaa 297
```

FIG. 25L

BLASTN 2.2.9 [May-01-2004]

Referencia:
Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1093542955-7329-189112109965.BLASTQ4

Consulta =

(360 Documentos)

Base de datos: todas las secuencias GenBan+EMBL+DDBJ+PDB (Pero no EST, STS, GSS, muestras ambientales o secuencias HTGS de fase 0, 1, o 2)
2,568,353 secuencias ;11,601,399,943 total de documentos

Si usted tiene cualquier problema o preguntas con los resultados de esta búsqueda por favor refierase al **BLAST FAQs**

Reportes Taxonómicos

Alineamiento significativo que produce secuencias:

	Clasificación (bits)	E Valor
gi|34539549|gb|AY369876.1| Inmu BaPFO-17 clon músculo Mus	232	4e-58
gi|3561043|gb|AF083186.1|AF083186 P anto-HIV-1 músculo Mus	232	4e-58
gi|11611972|gb|AF303833.1|AF303833 J558 clon músculo Mus	224	1e-55
gi|27501837|gb|AY172007.1| Im L2MZB-18.8 clon músculo Mus.	220	2e-54
gi|1050285|gb|L48675.1|MUBAF (Línea de células C3H/F2 músculo Mus	220	2e-54
gi|694014|gb|U20060.1|MMU20060 Anticuerpo anti-ADN músculo Mus	220	2e-54
gi|194590|gb|M33558.1|MUSIGHAANA Gamma- redispuesto Ig de ratón	220	2e-54
gi|9081896|gb|AF162710.1|AF162710 Singl constricción sintética	216	3e-53
gi|11611990|gb|AF303842.1|AF303842 J558 clon músculo Mus	214	1e-52
gi|7529620|emb|AJ277214.1|MMU277214 MR parcial músculo Mus	214	1e-52

FIG. 25M

Alineaciones

>gi|34539549|gb|AY369876.1| MRNA región bariable de cadena pesada de mu inmunoglobulina BaPFO-17 clon músculo Mus

Documento = 330

Clasificación= 232 bits (117), Esperado = 4e-58
Identidades = 150/161 (93%)
Hélice = Más / Más

```
Consulta: 36  gaagcctggggcttcagtgaaggtgtcctgcaaggcttctggttactcattcactggcta 95
              ||||||||||||||||||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sujeto:   12  gaagcctggggcttcagtgaagatatcctgcaaggcttctggttactcattcactggcta 71

Consulta: 96  ctacatgcactgggtgaagcagagccccggacagggccttgagtggattggacgtattaa 155
              |||||||||||||||||||||||||||  ||| || ||||||||||||||||||| ||||
Sujeto:   72  ctacatgcactgggtgaagcagagccatggaaagagccttgagtggattggacgtgttaa 131

Consulta: 156 tcctaacaatggtgttactctctacaaccagaaattcaagg 196
              |||||||||||||| ||||  |||||||||||| |||||||
Sujeto:   132 tcctaacaatggtggtactagctacaaccagaagttcaagg 172
```

Clasificación= 54.0 bits (27), Esperado= 2e-04
Identidades = 39/43 (90%)
Hélice = Más / Más

```
Consulta: 318 tatggactactggggtcaaggcacctggtcacgtctcctca 360
              ||||||||||||||||||||| |||  ||||||||||||||
Sujeto:   288 tatggactactggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcctca 330
```

FIG. 25N

BLASTN 2.2.9 [May-01-2004]

Referencia :
Altschul, Stephan F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1093843096-23529-46137698074.BLASTQ4

Consulta =

(360 Documentos)

Base de datos: todas las secuencias GenBan+EMBL+DDBJ+PDB (Pero no EST, STS, GSS, muestras ambientales o secuencias HTGS de fase 0, 1, o 2)
2,568,353 secuencias ;11,601,399,943 total de documentos

Si usted tiene cualquier problema o preguntas con los resultados de esta búsqueda por favor refierase al **BLAST FAQs**

Reportes Taxonómicos

Alineamiento significativo que produce secuencias:	Clasificación (bits)	E Valor
gi|47109385|emb|AJ704536.1| Anti-PL para construcción sintética	200	1e-48
gi|25988405|gb|AF453218.1| R-03VH clon para construcción sintética	192	4e-46
gi|11875739|gb|AF302820.1|AF302820 163 aislado Homo sapiens	192	4e-46
gi|3170764|gb|AF062151.1|AF062151 45u-26 clon Homo sapiens	192	4e-46
gi|3170748|gb|AF062143.1|AF062143 45u-17 clon Homo sapiens	192	4e-46
gi|557922|gb|S71521.1|S71521 (somati cadena pesada VH1-IgM Ig	192	4e-46
gi|33104|emb|X07448.1|HSIGMV35 Pesada Ig para gen V35 Humano	192	4e-46
gi|507208|emb|Z37312.1|HSIGVHC24 Inmun rediapuesto H. Sapiens	192	4e-46
gi|10697073|emb|AJ406653.2|HSA406653 v parcial Homo sapiens	192	4e-46
gi|15886969|emb|AJ414014.1|HSA414014 m parcial Homo sapiens	192	4e-46

FIG. 25O

Alineaciones

>gi|47108385|emb|AJ704536.1|
clon GLC4
Documento = 732

Clasificación= 200 bits (101), Esperado= 1e-48
Identidades = 146/161 (90%)
Hélice = Más/ Más

```
Consulta: 1   caggtccagctggtgcagtctggagccgaggtgaagaagcctggggcttcagtgaaggtg 60
              ||||| |||||||||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sujeto: 1     caggtgcagctggtgcagtctggggctgaggtgaagaagcctggggcttcagtgaaagtc 60

Consulta: 61  tcctgcaaggcttctggttactcattcactggctactacatgcactgggtgcgacaggcc 120
              |||||||||||||||||| ||| | ||||| ||||||||||||||||||||||| ||||||
Sujeto: 61    tcctgcaaggctctggatacacttcaccggctactacatgcactgggtgcgacaggcc 120

Consulta: 121 ccaggacaagggcttgagtggatgggacgtattaatcctaa 161
              || ||||| || ||||||||||||||| | ||||||||||
Sujeto: 121   cctggacaagggcttgagtggatgggatggattaatcctaa 161


Clasificación = 44.1 bits (22), Esperado= 0.21
Identidades = 28/30 (93%)
Hélice = Más / Más

Consulta: 262 tctgaggacacggccgtctattactgtgca 291
              |||||||||||| ||||| ||||||||||||
Sujeto: 262   tctgaggacacggccgtgtattactgtgca 291
```

FIG. 26A

IgG4_mutado Humano (Mutación de articulación S241P) (SEQ ID NO: 24)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Humano LgG1(SEQ ID NO: 25)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1 Humano (L234A, G237A) (SEQ ID NO: 85)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PEALGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1 Humano (L234A, L235A) (SEQ ID NO: 86)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 26B

IgG1 Humano (L235A, G237A) (SEQ ID NO: 87)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1 Humano (L234A, L235A, G237A) (SEQ ID NO: 88)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1 Humano (N297A) (SEQ ID NO: 89)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Kappa Humano (SEQ ID NO: 26)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 27A

H8 Quimérica (hIgG1/huKappa)

Kappa humano y VL 5T4-H8 Murina (SEQ ID NO:1)

SIVMTQTPTFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPTLLISYTSSRYAG
VPDRFIGSGYGTDFTFTISTLQAEDLAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

IgG1 humano y VH 5T4-H8 Murina (SEQ ID NO:2)

EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVKQSHGKSLEWIGRINPNNGV
TLYNQKFKDKAILTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMITNYVMDYWGQVT
SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIG. 27B

H8 Quimérica (hIgG4/huKappa)

Kappa humano y VL 5T4-H8 Murina (SEQ ID NO:3)

SIVMTQTPTFLLVSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPTLLISYTSSRYAG
VPDRFIGSGYGTDFTFTISTLQAEDLAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

IgG4_mutado humano y VH 5T4-H8 Murina (SEQ ID NO:4)

EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVKQSHGKSLEWIGRINPNNGV
TLYNQKFKDKAILTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMITNYVMDYWGQVT
SVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP*
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

FIG. 27C

H8 Semi-humanizada (muVH/huVL1)

Kappa humano y 5T4-H8 VL Humanizado (versión 1) (SEQ ID NO:5)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLISYTSSRYAG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

IgG4_mutado humano y VH 5T4-H8 Murina (SEQ ID NO:6)

EVQLQQSGPDLVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVKQSHGKSLEWIGRINPNNGV
TLYNQKFKDKAILTVDKSSTTAYMELRSLTSEDSAVYYCARSTMITNYVMDYWGQVT
SVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

FIG. 27D

H8 humanizado (Versión 1)

Kappa humano y 5T4-H8 VL Humanizado (versión 1) (SEQ ID NO:7)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLISYTSSRYAG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQDYNSPFTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

IgG4_mutado humano y VH 5T4-H8 Humanizado (SEQ ID NO:8)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVKQSPGQGLEWIGRINPNNGV
TLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

FIG. 27E

H8 humanizado (Versión ½)

Kappa humano y 5T4-H8 VL Humanizado (versión 1) (SEQ ID NO:9)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLISYTSSRYAG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

IgG4_mutado humano y VH 5T4-H8 Humanizado (CDR Injertado) (SEQ ID NO:10)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNNGV
TLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

FIG. 27F

Versión 2 anti-5T4 Humanizado

Kappa humano y 5T4-H8 VL Humanizado (CDR injertado) (SEQ ID NO:11)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQPPKLLIYYTSSRYAG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPFTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

IgG4_mutado humano y VH 5T4-H8 Humanizado (CDR injertado) (SEQ ID NO:12)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNNGV
TLYNQKFKDRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSTNITNYVMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

FIG. 27G

Versión 3 anti-5T4 Humanizado

Kappa humano y 5T4-H8 VL Humanizado (CDR Injertado) (SEQ ID NO:11)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDVAWYQQKPGQPPKLLIYYTSSRYAG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQDYNSPPTFGGGTKLEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

IgG4_mutado humano y VH 5T4-H8 Humanizado (versión 3) (SEQ ID NO:84)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGRINPNNGV
TLYNQKFKDRVTITRDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSTMITNYVMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPP
CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

FIG. 28A

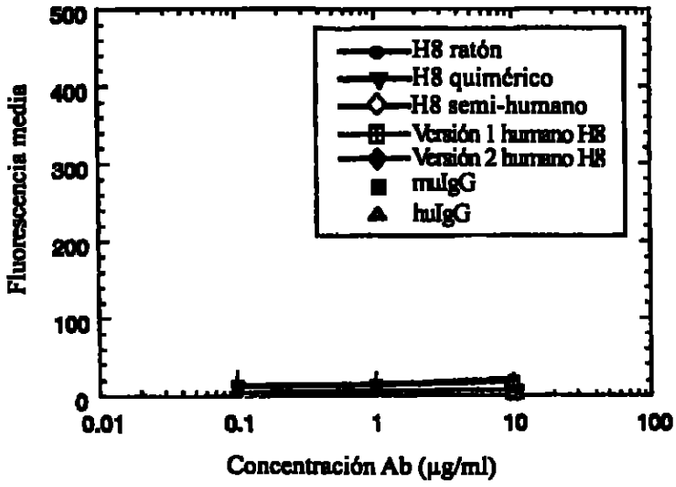


FIG. 28B

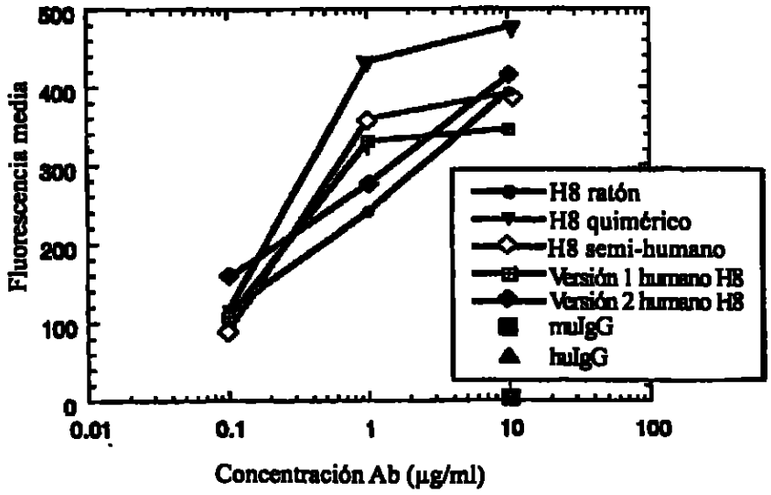


FIG. 29

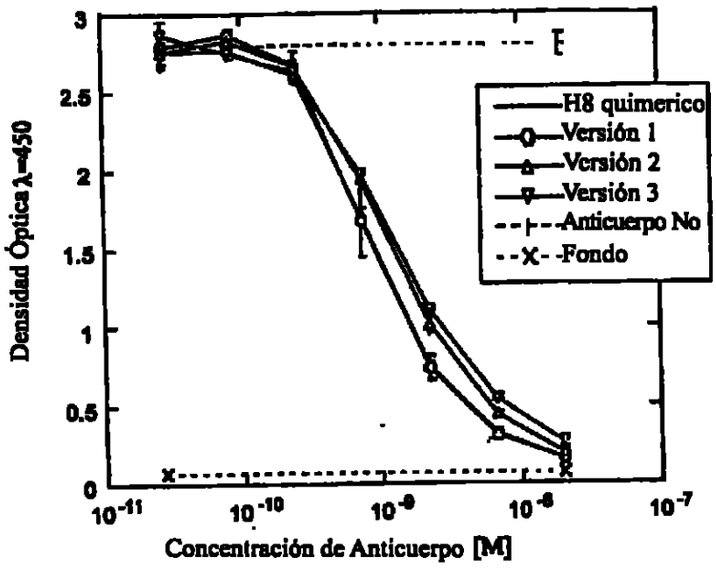

Densidad Óptica λ=450
Concentración de Anticuerpo [M]
H8 quimerico
Versión 1
Versión 2
Versión 3
Anticuerpo No
Fondo

FIG. 30

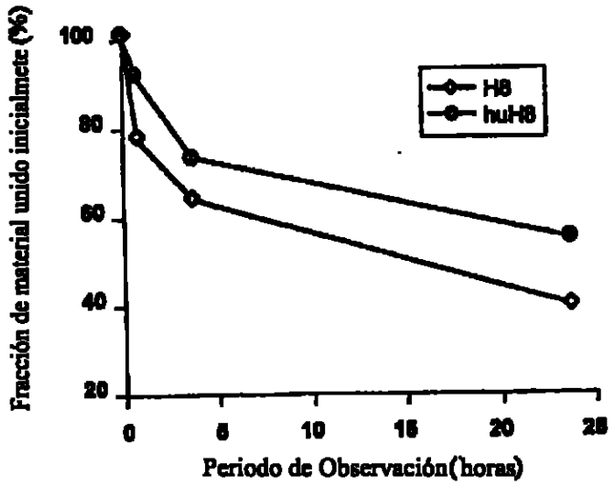

Fracción de material unido inicialmente (%)
Periodo de Observación(horas)
H8
huH8

FIG. 31

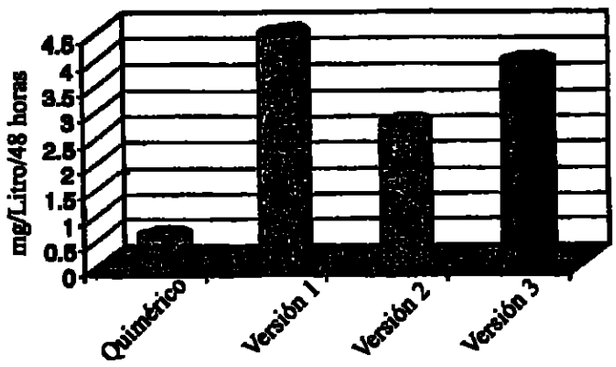

mg/Litro/48 horas
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Químérico
Versión 1
Versión 2
Versión 3

FIG. 32A

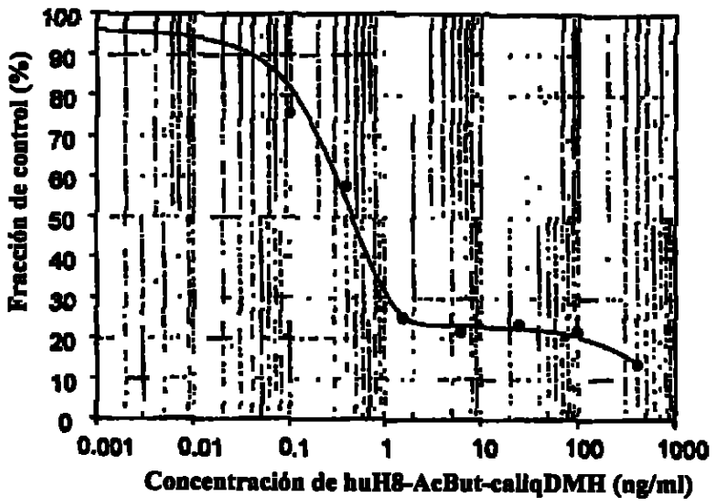
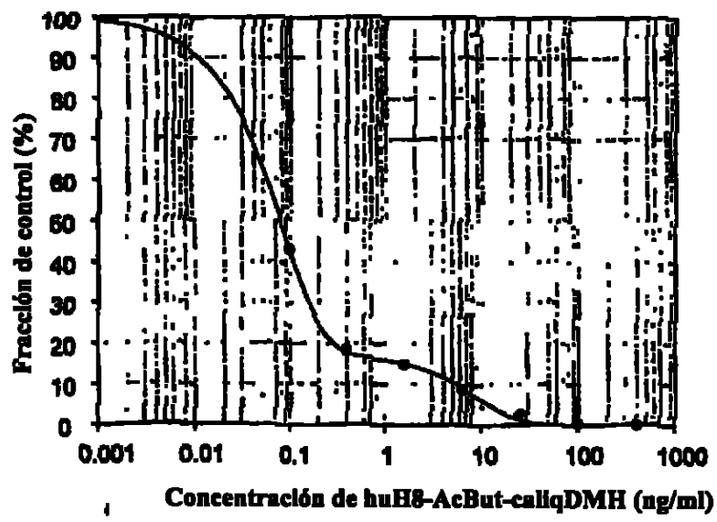


FIG. 32B



WO 2006/031653 56/63 PCT/US2005/032196

FIG. 33A

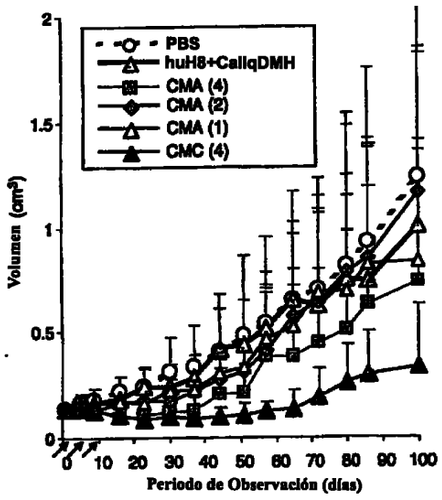
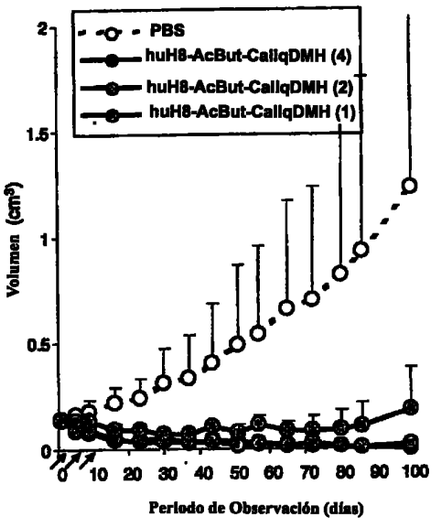


FIG. 33B



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

FIG. 33C

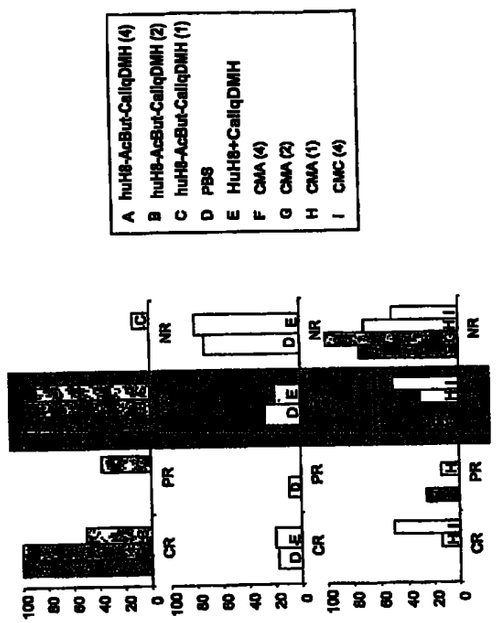

A huH9-AcBut-CalliqDMH (4)
B huH9-AcBut-CalliqDMH (2)
C huH9-AcBut-CalliqDMH (1)
D PBS
E HuH9+CalliqDMH
F CMA (4)
G CMA (2)
H CMA (1)
I CMC (4)
NR
PR
CR
100
80
60
40
20
0

FIG. 34A

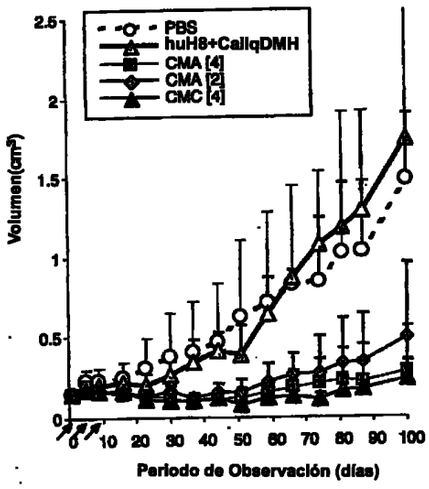
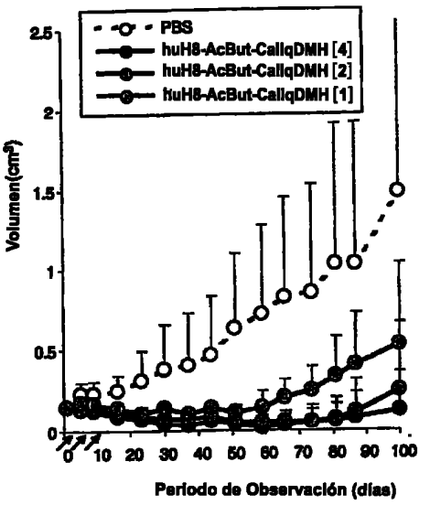
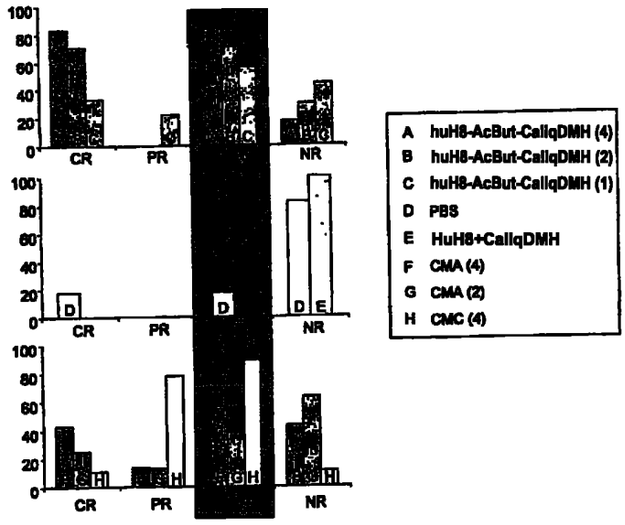


FIG. 34B



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

FIG. 34C



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

FIG. 35A

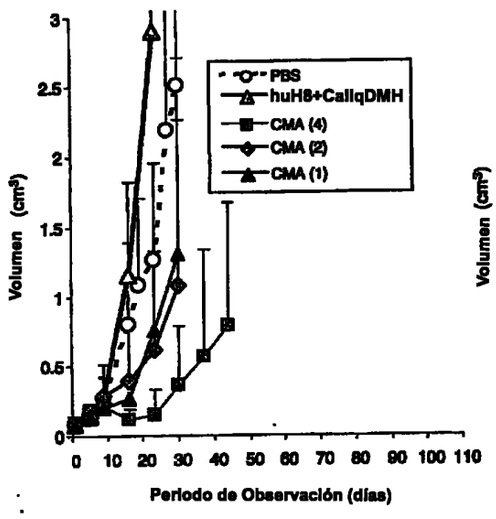
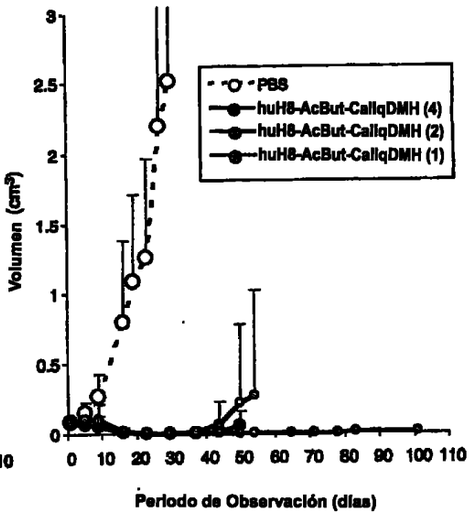


FIG. 35B



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

FIG. 35C

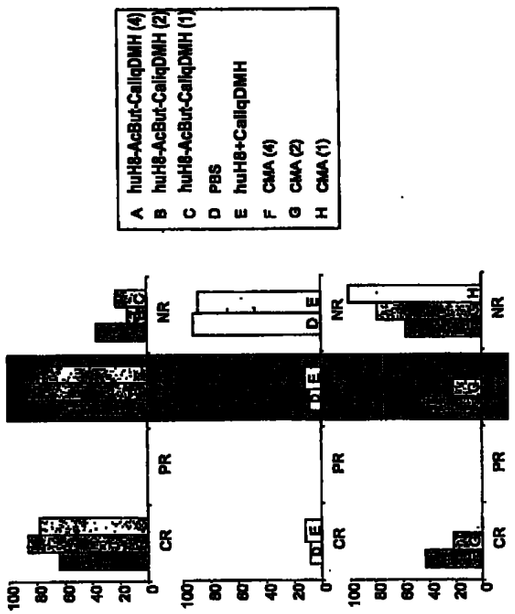

A huH8-AcBut-CalliqDMH (4)
B huH8-AcBut-CalliqDMH (2)
C huH8-AcBut-CalliqDMH (1)
D PBS
E huH8+CalliqDMH
F CMA (4)
G CMA (2)
H CMA (1)
NR
PR
CR
100
80
60
40
20
0

FIG. 35D

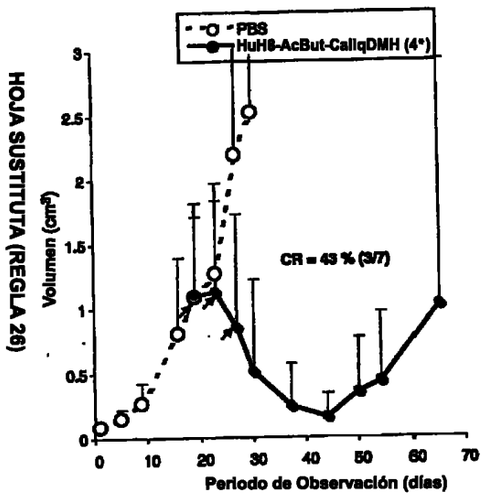
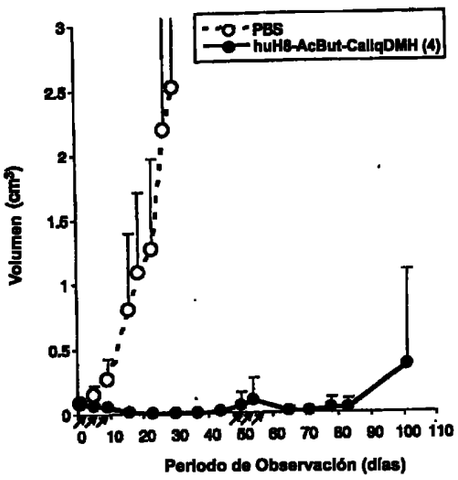


FIG. 35E



HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

FIG. 36B



FIG. 36A



LISTA DE SECUENCIA

PCT/US05/32196

<110> Wyeth

<120> ANTI-5T4 Y ANTICUERPO ANTI-5T4 HUMANIZADO/CONJUGADOS DE CALICHEAMICINA

<130> 040000-0317753

<160> 89

<170> Versión Petentin 3.3

<210> 1
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (1)..(107)
<223> Región variable de cadena liviana

<400> 1

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

PCT/US05/32196

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 2
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (1)..(120)
<223> Región variable de cadena liviana

<400> 2

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

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

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Val Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

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

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

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

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

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

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

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

PCT/US05/32196

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

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

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

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

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

Gly Lys
450

<210> 3
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (1)..(107)
<223> Región variable de cadena liviana

<400> 3

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

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

PCT/US05/32196

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 4
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (1)..(120)
<223> Región variable de cadena liviana

PCT/US05/32196

<400> 4

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

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

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Val Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

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

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

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

<210> 5
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

PCT/US05/32196

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (1)..(107)
<223> Región variable de cadena liviana

<400> 5

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 6
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (1)..(120)
<223> Región variable de cadena liviana

<400> 6

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

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

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Val Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

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

PCT/US05/32196

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

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

<210> 7
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (1)..(107)
<223> Región variable de cadena liviana

<400> 7

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

PCT/US05/32196

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 8
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (1)..(120)
<223> Región variable de cadena liviana

<400> 8

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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

PCT/US05/32196

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

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

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

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

<210> 9
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (1)..(107)
<223> Región variable de cadena liviana

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 10
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (1)..(120)
<223> Región variable de cadena liviana

<400> 10

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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

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

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

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

<210> 11
<211> 214
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (1)..(107)
<223> Región variable de cadena liviana

PCT/US05/32196

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (24)..(34)
<223> CDR 1

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (50)..(56)
<223> CDR 2

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (89)..(97)
<223> CDR3

<400> 11

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 12
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (1)..(120)
<223> Región variable de cadena liviana

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (26)..(35)
<223> CDR1

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (50)..(66)
<223> CDR2

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (99)..(109)
<223> CDR3

<400> 12

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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

PCT/US05/32196

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

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

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

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

<210> 13
<211> 417
<212> ADN
<213> Músculos Mus

<400> 13
atggaatgga gatgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccactctgag 60

gtccagctgc agcagtctgg acctgacctg gtgaagcctg gggcttcagt gaagatatcc 120

tgcaaggctt ctggttactc attcactggc tactacatgc actgggtgaa gcagagccat 180

ggaaagagcc ttgagtggat tggacgtatt aatcctaaca atggtgttac tctctacaac 240

cagaaattca aggacaaggc catattaact gtagacaagt catccaccac agcctacatg 300

gagctccgca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag atctactatg 360

attacgaact atgttatgga ctactggggt caagtaacct cagtcaccgt ctcctca 417

<210> 14
<211> 139
<212> PRT
<213> Músculos Mus

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (1)..(19)

PCT/US05/32196

<223> Secuencia líder

<220>
<221> PEPTIDO_NATURAL
<222> (20)..(139)

<400> 14

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asn Pro Asn Asn Gly Val Thr Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Val Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 15
<211> 381
<212> ADN
<213> Músculos Mus

<400> 15
atgaagtcac agacccaggt cttcgtattt ctactgatct gtgtgtatgg tgcgcatggg 60

agtattgtga tgacccagac tcccaaattc ctgcttgttt cagcaggaga cagggttacc 120

ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca acagaagcca 180

gggcagtctc ctaaactgct catacttat acatccagtc gctacgctgg agtccctgat 240

cgcttcattg gcagtggata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tttgcaggct 300

gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcaa gattataatt ctccctacac gttcggtgga 360

ggcaccagc tggaaatcaa a 381

<210> 16
<211> 127
<212> PRT
<213> Músculo Mus

<220>
<221> MISC_REPRESENTA
<222> (1)..(20)
<223> Secuencia líder

<220>
<221> PEPTIDO_NATURAL
<222> (21)..(127)

<400> 16

Met Lys Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Leu Leu Leu Cys Val Ser
1 5 10 15

Gly Ala His Gly Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Thr Phe Leu Leu
20 25 30

Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Thr Leu Leu Ile Ser Tyr Thr Ser Ser Arg Tyr Ala Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Ile Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
85 90 95

Thr Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr
100 105 110

Asn Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 17
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<400> 17

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

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

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

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

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

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

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

<210> 18
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<400> 18

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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

PCT/US05/32196

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<400> 19

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

PCT/US05/32196

<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<400> 20
caggtccagc tggtgcagtc tggagcogag gtgaagaago ctgggggctc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcatcact ggctactaca tgcactgggt gcgccaggcc 120

ccagggcagg gccttgagtg gatgggacgt attaatccta acaatggtgt tactcttcac 180

aaccagaaat tcaaggacog cgtgaccatg actcgcgaca cctccatcto cacagcctac 240

atggagctot ccgcctgcog ctctgacgac acggccgtct attactgtgc aogatccact 300

atgattacca actatgttat ggactactgg ggtcaaggca ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 21
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<400> 21

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

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

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

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

Lys Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 22

PCT/US05/32196

<210> 22
<211> 321
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<400> 22
gatattgtga tgacccagtc ccccgactcc ctggccgttt cactgggaga gagggccacc 60

atcaactgca agccccagtc agagtgttgag aatgatgttgg cttggtacca acagaagcca 120

gggcagcccc ctaagctgct catatactat acatccagtc gctacgctgg agtccctgat 180

cgcttcatcg gcagtggatc cgggaccgat ttcactctga ccatcagctc cttgcaggct 240

gaagacgtgg cagtttatta ctgtcagcaa gattatagtt ctcctccgac cttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 23
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial es derivada por secuencia de anticuerpo humano y ratón

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

<210> 24
<211> 327
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

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

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

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

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

PCT/US05/32196

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

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

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 25
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

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

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

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

PCT/US05/32196

09/89
470

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

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

<210> 26
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

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

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

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

<210> 27
<211> 114
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotido

<400> 27
cgcgcactcc gatattgtga tgacccagtc ccccgactcc ctggccgttt cactgggaga 60

gagggccacc ataaactgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttg 114

<210> 28
<211> 117
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleotido

<400> 28
gtaccaacag aagccagggc agtcccctaa gctgctcata tcctatacat ccagtcgcta 60

cgctggagtc cctgatcgct tctccggcag tggatccggg aacgatttca ctctgac 117

<210> 29
<211> 120
<212> ADN

PCT/US05/32196

<213> Artificial

<220>
<223> OligonucleoAtido

<400> 29
catcagctcc ttgcaggctg aagacgtggc agtttatttc tgtcagcaag attataattc 60

tcctcccacc ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa cgtgagtaga ataacttaat 120

<210> 30
<211> 105
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 30
taagttattc tactcacgtt tgatttccag cttggtgcct ccaccgaagg tgggaggaga 60

attataatct tgctgacaga aataaactgc caacgtcttca gcctg 105

<210> 31
<211> 116
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 31
caaggagctg atggtcagag tgaaatcggt cccggatcca ctgccggaga agcgatcagg 60

gaatccagcg tagcgactgg atgtataggg tatgagcagc ttaggggact gccctg 116

<210> 32
<211> 124
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 32
gcttctgttg gtaccaagcc acatcattac tcacactctg actggccttg cagtttatgg 60

tggccctctc tcccagtgaa acggccaggg agtcgggggg ctgggtcatc acaatatcgg 120

agtg 124

<210> 33
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

PCT/US05/32196

<223> Iniciador PCR

<400> 33
cagcccccta agctgctcat atactat 27

<210> 34
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador PCR

<400> 34
atagtatatg agcagcttag ggggctg 27

<210> 35
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador PCR

<400> 35
gtggcagttt attactgtca gcaag 25

<210> 36
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223>

<400> 36
cttgctgaca gtaataaact gccac 25

<210> 37
<211> 86
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 37
cgcgcactca caggtccagc tggtgcagtc tggagccgag gtgaagaagc ctggggctta 60

agtgaaggtg tcctgcaagg cttctg 86

<210> 38
<211> 90
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 38
gttactcatt cactggctac tacatgcact gggtgaagca gagccccgga cagggccttg 60

agtggattgg acgtattaat cctaacaatg 90

<210> 39
<211> 101
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 39
gtgttactct ctacaaccag aaattcaagg accgcgtgac catgactcgc gacacctcca 60

tctccacagc ctacatggag ctgtccgcgc tgcgctatga c 101

<210> 40
<211> 104
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 40
gacaccgccg tctattactg tgcaagctcc actatgatta ccaactatgt tatggactac 60

tggggtcaag gcaccctggt caccgtctcc tcaggtgagt cctg 104

<210> 41
<211> 99
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 41
tcgacaggac tcacctgagg agacggtgac cagggtgcct tgaccccagt agtccataac 60

atagttggta atcatagtgg agcgtgcaca gtaatagac 99

<210> 42
<211> 93
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 42
ggcggtgtcg tcagagcgca ggcgggagag ctccatgtag gctgtggaga tggaggtgtc 60

PCT/US05/32196

gcgagtcatg gtcacgcggt ccttgaattt ctg 93

<210> 43
<211> 92
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 43
gttgtagaga gtaacaccat tgttaggatt aatacgtcca atccactcaa ggccctgtcc 60

ggggctctgc ttcacccagt gcatgtagta gc 92

<210> 44
<211> 97
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 44
cagtgaatga gtaaccagaa gccttgcagg acacctttac tgaagccccc ggcttcttca 60

cctcggctcc agactgcacc agctggacct gggagtg 97

<210> 45
<211> 90
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 45
gttactcatt cactggctac tacatgcact gggtgcgcca ggcccccgga cagggccttg 60

agtggatggg acgtattaat cctaacaatg 90

<210> 46
<211> 92
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 46
gttgtagaga gtaacaccat tgttaggatt aatacgtccc atccactcaa ggccctgtcc 60

gggggcctgg cgcacccagt gcatgtagta gc 92

<210> 47
<211> 101

<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 47
gtgttactct ctacaaacag aaattcaagg accgcgtgac catcactgcc gacacctcca 60

cctccacagc ctacatggag ctctcctccc tgcgctctga g 101

<210> 48
<211> 93
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Iniciador PCR

<400> 48
ggcggtgtcc tcagagcgca gggaggagag ctccatgtag gctgtggagg tggaggtgtc 60

gcgagtgatg gtcacgcggt ccttgaattt ctg 93

<210> 49
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia 1 estructura de cadena pesada de anticuerpo consenso base en secuencia de anticuerpo humano

<400> 49

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

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

<210> 50
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia 2 estructura de cadena pesada de anticuerpo consenso base en secuencia de anticuerpo humano

<400> 50

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

PCT/US05/32196

<210> 51
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia 1 estructura de cadena pesada de anticuerpo consenso base en secuencia de anticuerpo humano

<400> 51

Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 52
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 53
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 54
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

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

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

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asn Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 55
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

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

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

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

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 56
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Glu Leu
20 25 30

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

Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr

<210> 57
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

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

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

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

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

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Arg Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 58
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

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

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

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

PCT/US05/32196

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

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 59
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

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

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

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

Gly Trp Ile Val Val Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Glu Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Met Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Ala

<210> 60
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 61
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

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

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

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 62
<211> 98

PCT/US05/32196

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

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

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

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

Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Thr

<210> 63
<211> 101
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Tyr Ser Thr Pro
100

<210> 64
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64

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

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

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

ly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg

<210> 65
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

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

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

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

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

Thr Val

<210> 66
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

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

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

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

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

<210> 67
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

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

PCT/US05/32196

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> 68
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 68

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 Pro
85 90 95

<210> 69
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

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

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

PCT/US05/32196

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp His Asn Leu Pro
85 90 95

<210> 70
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 70

Glu Ile Val Met 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 Ser
20 25 30

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

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

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

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

<210> 71
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

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

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

PCT/US05/32196

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

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

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

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

<210> 72
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 72

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

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

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

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

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

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

<210> 73
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro
85 90 95

<210> 74
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

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

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

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro
85 90 95

<210> 75
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

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

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

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

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

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

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

<210> 76
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

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

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

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

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

<210> 77
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

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

<210> 78
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

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

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

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

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

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

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

<210> 79
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

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

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

PCT/US05/32196

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

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser
85 90 95

<210> 80
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80

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

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

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

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

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

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

<210> 81
<211> 321
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial derivadas de anticuerpo humano y de ratón

<400> 81
gatattgtga tgacccagtc ccccgactcc ctggccgttt cactgggaga gagggccacc 60

ataaacotgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtacca acagaagcca 120

PCT/US05/32196

ggcagtccc ctaagctgct catatcctat acatccagtc gctacgctgg agtcccatgat 180

cgcttctccg gcagtggatc cgggaccgat ttcactctga ccatcagctc cttgcaggct 240

gaagacgtgg cagtttattt ctgtcaagca gattataatt ctcctcccac cttcggtgga 300

ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 82
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial derivadas de secuencia anticuerpo humano y de ratón

<400> 82
caggtccagc tggtgcagtc tggagccgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggctactaca tgcactgggt gaagcaggcc 120

cccggacagg gccttgagtg gattggacgt attaatccta acaatggtgt tactctctac 180

aaccagaaat tcaaggaccg cgtgaccatg actcgcgaca ctatcatctc cacagcctac 240

atggagctct ccgcctgcg ctctgacgac accgccgtct attactgtgc acgctccact 300

atgattacca actatgttat ggactactgg ggtcaaggca ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 83
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia artificial derivadas de secuencia anticuerpo humano y de ratón

<400> 83
caggtccagc tggtgcagtc tggagccgag gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggtta ctcattcact ggctactaca tgcactgggt gcgccaggcc 120

cccggacagg gccttgagtg gatgggacgt attaatccta acaatggtgt tactctctac 180

aaccagaaat tcaaggaccg cgtgaccatc actcgcgaca cctccacctc cacagcctac 240

atggagctct cctccctgcg ctctgaggac accgccgtct attactgtgc acgctccact 300

atgattacca actatgttat ggactactgg ggtcaaggca cactggtcac cgtctcctca 360

<210> 84
<211> 447
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

PCT/US05/32196

<223> Cadena pesada Humanizada con variable de región derivada por región constante IgG4 humano y ratón y humano

<400> 84

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Ser Thr Met Ile Thr Asn Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

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

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

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260 265 270

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

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

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

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

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

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

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

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440 445

<210> 85
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Leu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

PCT/US05/32196

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 86
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

PCT/US05/32196

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 87
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

PCT/US05/32196

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

PCT/US05/32196

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 88
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

PCT/US05/32196

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 89
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

PCT/US05/32196

00501
502

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Glu Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

PCT/US05/32196

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

PATENT COOPERATION TREATY

02503

504

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

To:
PILLSBURY WINTHROP SHAW PITTMAN LLP
Attn. Cawley Jr., Thomas A.
P.O. Box 10500
McLean VA 22102
UNITED STATES OF AMERICA

Date of mailing *(day/month/year)* 27/03/2006	
Applicant's or agent's file reference 40000/317753	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US2005/032196	International filing date *(day/month/year)* 09/09/2005
Applicant WYETH	

1. [x] The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

   Filing of amendments and statement under Article 19:
   The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

   When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

   Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70

   For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. [ ] The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. [ ] With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

   [ ] the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

   [ ] no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

   Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90*bis*.1 and 90*bis*.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

   The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

   Within 19 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

   In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

   See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Marilú Masserut

Form PCT/ISA/220 (January 2004) *(See notes on accompanying sheet)*

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims,description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Administrative Instructions, Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
40000/317753		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2005/032196	09/09/2005	10/09/2004
Applicant		
WYETH		

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International search report consists of a total of 6 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report
   a. With regard to the language, the International search was carried out on the basis of:
      [X] the International application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the International application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of International search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [X] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application, see Box No. I.

2. [X] Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. [ ] Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the title,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this International search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,
   a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1
      [X] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/032196

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   - [X] a sequence listing
   - [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   - [X] on paper
   - [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   - [X] contained in the international application as filed
   - [X] filed together with the international application in electronic form
   - [ ] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REP RT

International application No
PCT/US2005/032196

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K47/48 C07K16/30 C07K16/46 A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MYERS K A ET AL: "TARGETING IMMUNE EFFECTOR MOLECULES TO HUMAN TUMOR CELLS THROUGH GENETIC DELIVERY OF 5T4-SPECIFIC SCFV FUSION PROTEINS" CANCER GENE THERAPY, NORWALK, CT, US, vol. 9, no. 11, November 2002 (2002-11), pages 884-896, XP009007160 ISSN: 0929-1903 cited in the application abstract page 884, right-hand column, paragraph 1	1-49
X	WO 98/55607 A2 (KINGSMAN SUSAN MARY ET AL) 10 December 1998 (1998-12-10) cited in the application figure 1b; examples 1,12,13 -/-	1-45

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 March 2006	27/03/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Luyten, K

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	& DATABASE Geneseq [Online] 15 March 1999 (1999-03-15), "Anti-5T4 single chain antibody 5T4Sab1." XP002371117 retrieved from EBI accession no. GSN:AAW86003 Database accession no. AAW86003 the whole document	8,11-18
Y	US 2004/082764 A1 (KUNZ ARTHUR ET AL) 29 April 2004 (2004-04-29) cited in the application examples 1-3,6,8	1-49
Y	SIEVERS E L ET AL: "Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: A phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate" BLOOD, vol. 93, no. 11, 1 June 1999 (1999-06-01), pages 3678-3684, XP002370115 ISSN: 0006-4971 cited in the application abstract	1-49
T	WO 2005/089809 A (WYETH; KUNZ, ARTHUR; HAMANN, PHILIP, ROSS; MORAN, JUSTIN, KEITH; VIDUN) 29 September 2005 (2005-09-29) the whole document	1-45

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/032196

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 46-49
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 46-49 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2005/032196

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9855607 A2	10-12-1998	AU 747602 B2	16-05-2002
		AU 7780198 A	21-12-1998
		CA 2292760 A1	10-12-1998
		CN 1258319 A	28-06-2000
		EP 1012259 A2	28-06-2000
		JP 2002507117 T	05-03-2002
		NO 995901 A	04-02-2000
		NZ 500633 A	25-10-2002
		US 6852703 B1	08-02-2005
US 2004082764 A1	29-04-2004	US 2004192900 A1	30-09-2004
WO 2005089809 A	29-09-2005	WO 2005089807 A2	29-09-2005
		WO 2005089808 A2	29-09-2005

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43*bis*.1)

Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220	Date of mailing *(day/month/year)* see form PCT/ISA/210 (second sheet) **FOR FURTHER ACTION** See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2005/032196	09.09.2005	10.09.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K47/48 C07K16/30 C07K16/48 A61P35/00

Applicant
WYETH

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:

European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl
Fax: +31 70 340 - 3016

Authorized Officer

Luyten, K

Telephone No. +31 70 340-8924

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2005/032196

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

   ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).

2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

   ☒ a sequence listing

   ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

   ☒ in written format

   ☒ in computer readable form

   c. time of filing/furnishing:

   ☒ contained in the international application as filed.

   ☒ filed together with the international application in computer readable form.

   ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2005/032196

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 46-49 (with respect to industrial applicability)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. with respect to industrial applicability: 46-47 (partially) and 48-49 (completely) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination *(specify)*:

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form	☐	has not been furnished
	☐	does not comply with the standard
the computer readable form	☐	has not been furnished
	☐	does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

WRITTEN OPINION F THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTH RITY

International application No.
PCT/US2005/032196

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	3,5-7,9-10,20-49
	No:	Claims	1,2,4,8,11-19
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-49
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-45
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No. PCT/US2005/032196

5/6

SECTION III

Claims 46-47 (partially, with respect to an *in vivo* method) and claims 48-49 (completely) relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

SECTION V

1 PRIOR ART

D1: Myers K A et al: "Targeting immune effector molecules to human tumor cells through genetic delivery of 5T4-specific scFV fusion proteins" Cancer Gene Therapy, Norwalk, CT, US, vol. 9, no. 11, November 2002 (2002-11), pages 884-896, XP009007160 ISSN: 0929-1903 (cited in the application)

D2: WO 98/55607 A2 (Kingsman Susan Mary et al) 10 December 1998 (1998-12-10) (cited in the application)

D3: DATABASE Geneseq [Online] 15 March 1999 (1999-03-15), "Anti-5T4 single chain antibody 5T4Sab1." retrieved from EBI accession no. GSN:AAW86003 Database accession no. AAW86003

D4: US 2004/082764 A1 (Kunz Arthur et al) 29 April 2004 (2004-04-29) (cited in the application)

D5: Sievers E L et al: "Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: A phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate" BLOOD, vol. 93, no. 11, 1 June 1999 (1999-06-01), pages 3678-3684, XP002370115 ISSN: 0006-4971 (cited in the application)

1.1 Document D1 discloses a chimeric, humanized anti-5T4 antibody comprising a murine scFv fused to human IgG1 Fc. This scFv-HIgG1 fusion protein is able to direct lysis of 5T4-expressing human tumor cell lines through antibody-dependent cell cytotoxicity, indicating its potential as a gene therapy for human cancers (Abstract). D1 also mentions the use of antibodies targeted to tumor-associated antigens linked to a cytotoxic drug, e.g. calicheamicin, in the treatment of cancer (page 884, right-hand column, paragraph 1).

1.2 Document D2 discloses two chimeric, humanized anti-5T4 antibodies comprising a murine scFv fused to either human IgG1 Fc or human IgE1 (Examples 1, 12 and 13, Figure 1b). Document D3 discloses the amino acid sequence encoded by the scFv-IgG cDNA, 5T4Sab1, of document D3. Amino acids 23-142 of this sequence are 100% identical to amino acids 1-120 of SEQ ID NO:2 of the present application. Amino acids 158-264 are 86% identical to SEQ ID NO:17. The CDRs are 100% identical to the CDRs of SEQ ID NO: 17 and 18.

1.3 Document D4 discloses an anti-CD22 antibody/calicheamicin conjugate (CMC-544), obtained through the conjugation of a humanized anti-CD22 antibody to N-acetyl-gamma calicheamicin dimethyl hydrazide 4-(4-acetylphenoxy)butanoic acid N-hydroxysuccinimide (Examples 1-3). CMC-544 was shown to be effective in an *in vivo* mouse model of B-cell lymphoma (Examples 6, 8).

1.4 Document D5 discloses the medical use of an anti-CD33 antibody/drug conjugate, consisting of a humanized anti-CD33 antibody linked to calicheamicin, for treating patients with relapsed or refractory CD33-positive acute myeloid leukemia (Abstract).

2 NOVELTY (Art. 33(2) PCT)

2.1 Although the binding affinity of the chimeric, humanized anti-5T4 antibody, scFv-HIgG1, is not explicitely mentioned in D1, since the binding affinity of the monoclonal antibody of which it is derived is 1.85×10^{-11} M and those of the other scFv constructs are 7.90×10^{-10} M and 1.24×10^{-9} M, it is assumed that its binding affinity is about 10^{-9} to 10^{-11} M. Therefore, it falls within the scope of claim 1 (a) and document D1 anticipates the novelty of claims 1, 2 and 4. Furthermore, due to the functional definitions in claim 1 (e)-(h), the chimeric antibodies of both document D1 and D2 fall within the scope of claim 1 (e)-(h).

2.2 The chimeric, humanized anti-5T4 antibody of document D2 comprises an amino acid sequence (Document D3, AA 23-142) that is 100% identical to SEQ ID NO:2, therefore claim 8 is not novel over document D2 and D3. Also the CDRs of this antibody are 100% identical to those of SEQ ID NO:17 & 18, and the framework region, although murine, comprises residues of a human antibody framework region.

3.4 Claim 29 differs from document D1 in that the cytotoxicity of the chimeric or humanized anti-5T4 antibody is not due to antibody-dependent cell cytotoxicity but due to a drug bound to the antibody. The effect of this difference is not known. The problem to be solved may therefore be regarded as providing an alternative chimeric or humanized 5T4 antibody construct. The solution of claim 29 is not considered as involving an inventive step, since it is a mere arbitrary solution. If a particular effect could be attributed to the antibody/drug conjugate of claim 29, then it would still not be inventive, since document D1 already mentions the linkage of antibodies targeted to tumor-associated antigens with a cytoxic drug, e.g. calicheamicin, and the use of these antibody/drug conjugates in the treatment of cancer. Moreover, examples of the production of antibody/drug (calicheamicin) conjugates and their use in the treatment of lymphoma or leukemia, can be found in documents D4 and D5. The same reasoning applies for the use of the chimeric or humanized anti-5T4 antibody/drug conjugates according to the methods of claim 46-49, therefore said claims also lack an inventive step.

3.5 Dependent claims 31-45 do not appear to contain any additional features which, in combination with the features of the claims they refer to, involve an inventive step as the relevant subject-matter falls within the knowledge and ability of the skilled person and does not provide a surprising effect.

3.6 The solution as in dependent claim 30 is not solving the problem posed, since the antibody is not sufficiently defined (see 5.1-5.3). However, even if the antibody would be well-defined, like in claims 31-45, it would still not be inventive for the same reasons as under 3.4 and 3.5.

3.7 In view of the above, the present application does not meet the requirements of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 3, 5-7, 9-10 and 20-49 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

4 For the assessment of the present claims 46-49 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to

WRITTEN PINI N OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.
PCT/US2005/032196

Therefore claims 11-18 do not appear to be novel over documents D2 and D3.

2.3 The chimeric, humanized anti-5T4 antibody of document D2 comprises an amino acid sequence (Document D3, AA 158-264) that is 86% identical to SEQ ID NO:17, therefore claim 19 is not novel over document D2 and D3.

2.4 The prior art does not disclose any anti-5T4 antibody/drug conjugates, thus claims 29-49 appear to be novel.

2.5 In summary, claims 3, 5-7, 9-10 and 20-49 are novel, though the present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1, 2, 4, 8 and 11-19 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

3 INVENTIVE STEP (Art. 33(3) PCT)

3.1 Document D1 is regarded as the closest prior art to the subject-matter of claims 3, 5-7, 9-10 and 20-49.

3.2 Claims 3, 5-7, 9-10 and 20-28 differ from document D1 in that the chimeric or humanized anti-5T4 antibody comprises a human kappa light chain constant region (claim 3) or has a different sequence (5-7, 9-10 and 20-28). The effect of the differences of the subject-matter of claims 3, 5-7, 9-10 and 20-28 over the prior art is not known. The problem to be solved may therefore be regarded as providing an alternative chimeric or humanized 5T4 antibody.

3.3 The solutions as in claims 3, 5-7 and 20-22 are not solving the problem posed, since the antibodies are not sufficiently defined (see 5.3). Only antibodies of which the full heavy and light chain variable regions are defined can be considered to have the characteristics and properties of the antibodies exemplified in the application. Thus, only well-defined antibodies solve the problem. However, even if the antibodies would be well-defined, like in claims 9-10 and 23-28, they would still not be inventive, since without surprising effect, they fall within the routine skills of those skilled in the art and merely solve a standard problem.

the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

SECTION VIII

5 CLARITY AND SUPPORT (Art. 6 PCT)

5.1 The subject-matter of claim 1 is not clearly defined, since claim 1(d) attempts to define the antibody in terms of the result to be achieved "specifically binds to human 5T4 antigen with a binding affinity greater than a binding affinity of murine H8 anti-5T4 antibody". Though, the technical features necessary for achieving this result or function are not provided. Also the functional definition in 1(e), "specifically targets 5T4-expressing cells *in vivo*", does not provide the technical feature(s) to distinguish from chimeric or humanized anti-5T4 antibodies that specifically target 5T4-expressing cells in general or only *in vitro*. However, if those definitions would be combined with the structural features (sequences) of the heavy and light chain variable regions (see 5.3), the subject-matter of claim 1 would be clear.

5.2 The same reasoning applies for the antibody/drug conjugate of claim 30.

5.3 In the dependent claims 2-8, 11-22 the antibodies are in addition defined by further structural features, however, they are structurally not fully defined and therefore still lack clarity for the following reasons:

An antibody is structurally made of two light and two heavy chains and the combination of the heavy and light chain variable regions confers the antigen-binding specificity. The CDRs in combination with certain residues of the framework and the relative disposition of the CDRs determines the antigen-binding specificity. The framework, furthermore, influences the stability of the antibody. In general, simply combining the CDR sequences from one antibody with the framework sequence of a second one is not sufficient to retain antigen recognition. Thus, to define an antibody structurally the full sequence of the heavy and light chain variable regions should be specified. However, claims 2-8, 11-22 relate to anti-5T4 antibodies which are

structurally only defined by their constant regions (claims 2-6), by one or more CDRs (claims 11-18) or by either the heavy or light chain (claims 7-8, 19-22).

Therefore, claims 1-8, 11-22 and 30 relate to an large number of possible antibodies, for which it is unlikely that they will all have the properties of the antibodies as exemplified and thus claims 1-8, 11-22 and 30 lack clarity and support.

5.4 Furthermore, the following terms are vague and render the claims unclear: "at least one light chain or at least one heavy chain" (see 5.3; claims 1 and 11), "domain" (only part of one chain; see 5.3, claims 1 and 30), "fragment" (not all fragments are functional; claims 1-28, 46 and 48), "framework regions comprising residues of a human antibody framework region" (claim 11), "consensus sequence" (claim 12), "indirectly bound" (claims 29, 46 and 48), "derivatives" (claim 45), "therapeutic agent" (claims 48-49), the different "agents", "inhibitors" and the "therapeutic nucleic acid" of claims 37 and 39.

5.5 Claim 47 attempts to define the subject-matter in terms of the result to be achieved, "wherein the drug is internalized in a target cell", which merely amounts to a statement of the underlying problem, without providing the technical features necessary for achieving this result. Therefore, claim 47 lacks clarity and support.

5.6 Moreover, the application lacks support for the medical use of an anti-5T4/calicheamicin conjugate in combination with a second therapeutic agent (claim 49).

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
(Artículo 18 y Reglas 43 y 44 del PCT)

Referencia al expediente del solicitante o del mandatario	PARA ACCION ADICIONAL ver Notificación de la Transmisión del Reporte de Búsqueda Internacional (Forma PCT/ISA/220) así como, en donde aplique el inciso 5 posterior	
40000/317753		
No. de solicitud internacional	Fecha de presentación internacional (día/mes/año)	(Fecha de Prioridad) (La más cercana) (día/mes/año)
PCT/US2005/032196	09/09/2005	10/09/2004
Solicitante WYETH		

Este reporte de búsqueda internacional ha sido preparado por esta Autoridad de la Búsqueda Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 18. Se transmite una copia a la Oficina Internacional.

Este reporte de búsqueda internacional consiste de un total de 6 hojas

☒ También está acompañado de una copia de cada documento de la técnica anterior citado en este reporte.

1. Bases del reporte.

a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional se ha llevado a cabo en base

☒ a la solicitud internacional en el idioma en el que se presentó.
☐ la traducción de la solicitud internacional EN_____ en la cual el idioma de traducción se presenta para los propositos de la busqueda internacional (Regla 12..3 (a) y 23.1(b)).

b. ☒ Con respecto a cualquier secuencia de aminoácido y/o nucleótido descrito en la solicitud internacional, ver recuadro No. I

2. ☒ **Ciertas reivindicaciones no son localizables** (ver el Cuadro II).

3. ☐ **La unidad de la invención es deficiente** (ver el Cuadro II).

4. Con respecto al título,

☒ el texto se aprueba tal como lo presentó el solicitante,

☐ El texto se ha establecido que el texto sea como sigue:

5. Con respecto al resumen,

☒ El texto se aprueba tal como lo presentó el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto, de acuerdo con la Regla 38.2(b), tal como aparece en el Cuadro IV. El solicitante puede, dentro de un mes a partir de la fecha de envío por correo de este reporte de búsqueda internacional, proporcional comentarios a esta autoridad.

6. Con respecto a los dibujos

a. La figura de los dibujos, que se va a publicar con el resumen es la Figura No 1.

☒ Como lo sugirió el solicitante.

☐ Porque al solicitante le faltó sugerir una figura.

☐ Porque esta figura caracteriza mejor la invención.

b. ☐ Ninguna de las figuras se pueden publicar con el resumen.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Número de Solicitud Internacional
PCT/US2005/032196

Recuadro I. Secuencias de nucleótido y/o aminoácido (Continuación del punto 1.b de la primera hoja).

1. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos descrita en la solicitud internacional y necesaria para reivindicar la invención, esta opinión se ha establecido con la base de:

a. tipo de material:
[X] un listado de secuencias
[ ] tablas que se refieren al listado de secuencias

b. formato del material:
[X] en formato escrito
[X] en forma legible en computadora

c. tiempo de presentación/publicación
[X] contenido en la solicitud internacional como se presentó
[X] presentado junto con la solicitud internacional en forma legible en computadora
[ ] publicado posteriormente antes esta Autoridad para los propósitos de búsqueda

2. [ ] Además, en caso que más de una versión o copia del listado de secuencias y/o tabla con relación a esto se hallan presentado o publicado, se publicarán declaraciones requeridas de que la información en las copias posteriores o adicionales es idéntica a la que está en la solicitud como se presentó o no va más allá de la solicitud como se presentó, como sea apropiado.

3. Comentarios adicionales

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de Solicitud Internacional
PCT /US2005/032196

A. CLASIFICACION DEL ASUNTO RELACIONADO
A61K47/48 C07K16/30 C07K16/46 A61P35/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o tanto la clasificación nacional como la IPC.

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por los símbolos de clasificación)
A61K C07K

Documentación buscada diferente de la documentación mínima, al grado que estos documentos se incluyen en los campos buscados.

Base de datos, electrónica, consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos, donde se puede practicar, términos de búsqueda usados).
EPO-INTERNAL, Busqueda de secuencia BIOSIS, DATO WPI

C. DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERAN PERTINENTES

Categoría*	Citación del documento, con indicación, donde es apropiado, de los pasajes pertinentes	Pertinente para la reivindicación No
X	MYERS K A ET AL: "TARGETING IMMUNE EFFECTOR MOLECULES TO HUMAN TUMOR CELLS THROUGH GENETIC DELIVERY OF 5T4-SPECIFIC SCFV FUSION PROTEINS" CANCER GENE THERAPI, NORWALK, CT, US, VOL. 9, no.11, Noviembre 2002 (2002-11), Páginas 884-896, XP 009007160 ISSN: 0929-1903 Citado en la solicitud Resumen Pagina884, columna del lado derecho, párrafo 1	1-49
X	W0 98/55607 A2 (KINGSMAN SUSAN MARY ET AL) 10 DICIEMBRE 1998 (1998.12-10) Citado en la solicitud Figura 1b; ejemplos 1,12,13	1-45

[X] Documentos adicionales se listan en la continuación del cuadro C.

[X] Los miembros de la familia de patentes se listan en el anexo

* Categoría especial de los documentos citados:

"A" Documento que define el estado general de la técnica, que no se considera que es de pertinencia particular

"E" Documento anterior, pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

"L" Documento que puede crear dudas de la reivindicación(es) de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra situación u otra razón especial (como se especifique)

"O" Documento que se refiere a una descripción oral, uso, exhibición u otro medio

"P" Documento publicado antes de la fecha de presentación internacional, pero después de la fecha de prioridad reivindicada

"T" documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o la fecha de prioridad, y que no provoca conflicto con la solicitud, pero se cita para entender el principio o teoría que trata la invención

"X" documento de pertinencia particular; la invención reivindicada no se puede considerar nueva o no se puede considerar que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

"Y" documento de pertinencia particular; la invención reivindicada no se puede considerar que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más de estos documentos, estas combinaciones son obvias para una persona experta en la técnica

"&" documento miembro de la familia de patentes

Fecha de la actual terminación de la búsqueda internacional	Fecha de envío del reporte de búsqueda internacional
13 MARZO 2006	**27/03/2006**

Nombre y dirección de envío ISA/US	Funcionario autorizado
Oficina Europea de Patentes, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk TEL.(+31-70)340-2040, Tx.310651 epo nl, Fax:+31-70)340-3016	Luyten, K

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de Solicitud Internacional PCT/US2005/032196

C. (Continuación) DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERAN PERTINENTES

Categoría*	Citación del documento, con indicación, donde es apropiado, de los pasajes pertinentes	Pertinente para la reivindicación No.
X	& BASE DE DATOS Geneseq [online] 15 Marzo 1999 (1999-03-15), "Anti-5T4 Single chain antibody 5T4Sab1." XP002371117 Recuperado de EBI no. de acceso Gen:aaw86003 Número de acceso a la base de datos AAW86003 El documento completo	8,11-18
Y	US 2004/082764 A1 (KUNZ ARTHUR ET AL) 29 Abril 2004 (2004-04-29) citado en la solicitud ejemplo1-3,6,8	1-49
Y	SIEVERS E L ET AL: "Selective ablation de acute myeloid leukemia using Antibody- targetedchemotherapy: A PHASE 1 Study de an anti-CD33calicheamicin Immunoconjugate" BLOOD Vol. 93, no. 11, 1 junio 1999 (1999-06-01), Paginas 36783684, XP002370115 ISSN: 0006-4971 Ctado en la solicitud resumen	1-49
T	WO 2005/089809 A (WYETH; KUNZ, ARTHUR; HAMANN, PHILIP, ROSS; MORAN, JUSTIN, KEITH;VIDUN) 29 Septiembre 2005 (2005-09-29) el documento completo	1-45
X		

REPORTE DE BUQUEDA INTERNACIONAL

Número de Solicitud Internacional
PCT/US2005/032196

00226

522

Recuadro II. Observaciones donde ciertas reivindicaciones no fueron localizables (Continuación del punto 1 de la primera hoja).

Este reporte de búsqueda internacional no se ha establecido con respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. [X] Reivindicaciones Nos: 46-49

Debido a que se relacionan con el tema que no requiere que sea buscado por esta Autoridad, especificamente:

No obstante que las reivindicaciones 46-49 se dirigen a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, se ha llevado a cabo la búsqueda y se ha basado en los supuestos efectos del compuesto/composición

2. [ ] Reivindicaciones Nos.: -

Debido a que se relacionan con las partes de la solicitud internacional que no cumple con los requerimientos prescritos a un grado tal que no se puede llevar a cabo la búsqueda internacional significativa, especificamente:

3. [ ] Reivindicaciones Nos.:

Debido que son reivindicaciones dependientes y no asignan con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Recuadro III. Observaciones donde la unidad de la invención es deficiente (Continuación del punto 3 de la primera hoja).

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiples invenciones en esta solicitud internacional, como sigue:

1. [ ] Puesto que todas las tasas de búsqueda, adicionales requeridas se pagaron oportunamente por el solicitante, este reporte de búsqueda cubre todas las reivindicaciones buscables.

2. [ ] Puesto que todas las reivindicaciones buscables podrían ser buscadas sin esfuerzo que justifique una tasa adicional, esta Autoridad no solicitó el pago de cualquier tasa adicional.

3. [ ] Puesto que únicamente algunas tasas de búsqueda, adicionales, requeridas se pagaron oportunamente por el solicitante, este reporte de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron las tasas, especificamente las reivindicaciones Nos.:

4. [ ] Ninguna de las tasa de búsqueda, adicionales, requeridas se pagaron oportunamente por el solicitante. En consecuencia, este reporte de búsqueda internacional se restringe a la invención mencionada primero en las reivindicaciones, se cubre por las reivindicaciones Nos.:

Comentario de protesta

[ ] Las tasas de búsqueda, adicionales se acompañan por la protesta del solicitante.

[ ] Ninguna protesta acompaña al pago de las tasas de búsqueda, adicionales.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información sobre los miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.: PCT/US2005/032196

Documento de la patente citado en el reporte de búsqueda		Fecha de publicación	Miembros de la familia de patentes			Fecha de publicación
WO 9855607	A2	10-12-1998	AU	747602	B2	16-05-2002
			AU	7780198	A	21-12-1998
			CA	2292760	A1	10-12-1998
			CN	1258319	A	28-06-2000
			EP	1012259	A2	28-06-200
			JP	2002507117	T	05-03-2002
			NO	995901	A	01-02-2000
			NZ	500633	A	25-10-2002
			US	6852703	B1	08-02-2005
US2004082764	A1	29-04-2004	US	2004192900	A1	30-09-2004
WO 2005089809	A	29-09-2005	WO	2005089807	A2	29-09-2005
			WO	2005089808	A2	29-09-2005

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES

00528

De la AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para:

Ver Forma PCT/220

PCT

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (Regla 43 bis.1)

Fecha de envío *(día/mes/año)* Ver forma PCT/ISA/120 (Segunda hoja)	
Referencia de archivo del solicitante o mandatario: Ver forma PCT/ISA/220	PARA ACCION ADICIONAL Ver párrafo 2 abajo
No. de solicitud internacional: PCT/US2005/032196	Fecha de presentación internacional *(día/mes/año)*: 09.09.2005
	Fecha de Prioridad *(día/mes/año)*: 10.09.2004
Clasificación de Patente Internacional (IPC) o tanto Clasificación nacional como IPC: INV.A61K47/48 CO7K16/30 CO7K16/46 A61P35/00	
Solicitante: WYETH	

1. Esta opinión contiene indicaciones con relación a los siguientes puntos

- [X] Recuadro No. I — Base de la opinión
- [ ] Recuadro No. II — Prioridad
- [X] Recuadro No. III — Ningún establecimiento del reporte con respecto a la novedad, etapa inventiva, o aplicabilidad industrial
- [ ] Recuadro No. IV — Carencia de unidad de la invención
- [X] Recuadro No. V — Establecimiento razonado conforme a la Regla 43 bis.(i) con respecto a la novedad, etapa inventiva o aplicación Industrial; citas y explicaciones que soportan tal establecimiento.
- [ ] Recuadro No. VI — Ciertos documentos citados
- [ ] Recuadro No. VII — Ciertos defectos en la solicitud internacional
- [X] Recuadro No. VIII — Ciertas observaciones en la solicitud internacional.

2. ACCION ADICIONAL

Si se hace una solicitud de examen preliminar internacional, esta opinión usualmente se considerará que es la opinión escrita de la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica donde el solicitante elige una Autoridad diferente a este para ser la IPEA y la IPEA elegida tiene notificación de la Oficina Internacional bajo la Regla 66.1bis(b) que las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional no serán consideradas.

Si esta opinión es, como se proporciona arriba, considerada para ser una opinión escrita de la IPEA, se le invita al solicitante a exponer a la IPEA una respuesta escrita junto, donde sea apropiado, con enmiendas, antes de que expire los tres meses a partir de la fecha de envío de la Forma PCT/ISA/220 o antes de que expiren los 22 meses a partir de la fecha de prioridad, lo que sea más tarde.

Para opciones adicionales, ver Forma PCT/ISA/220

3. Para detalles adicionales, ver notas para la Forma PCT/ISA/220.

Nombre y dirección de envío de la IPEA/	Oficial autorizado
Oficina Europea de Patentes - P-B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280hv Rijswijk- Países Bajos Tel. +31 70 340 – 2040 Tx:31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Luyten, k Teléfono No. +31 70 340-8924

I. Bases del Reporte

1. Con respecto al idioma, esta opinión se ha establecido con base en la solicitud internacional en el idioma en la cual se presentó, salvo que se indique bajo este punto.

☐ Esta opinión se basa en la traducción del idioma original en el siguiente idioma, que es el idioma de la traducción publicada para propósitos de búsqueda internacional (bajo las Reglas 12.3 y 23.1(b))

2. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos descrita en la solicitud internacional y necesaria para reivindicar la invención, esta opinión se ha establecido con la base de:

a. tipo de material:
[X] un listado de secuencias
[ ] tablas que se refieren al listado de secuencias

b. formato del material:
[X] en formato escrito
[X] en forma legible en computadora

c. tiempo de presentación/publicación
[X] contenido en la solicitud internacional como se presentó
[X] presentado junto con la solicitud internacional en forma legible en computadora
[ ] publicado posteriormente antes esta Autoridad para los propósitos de búsqueda

3. [ ] Además, en caso que más de una versión o copia del listado de secuencias y/o tabla con relación a esto se hallan presentado o publicado, se publicarán declaraciones requeridas de que la información en las copias posteriores o adicionales es idéntica a la que está en la solicitud como se presentó o no va más allá de la solicitud como se presentó, como sea apropiado.

4. Comentarios adicionales

Recuadro No. III. No establecimiento de opinión con respecto a novedad, etapa inventiva y aplicación industrial

Las preguntas de que la invención parece ser novedosa, involucrar una etapa invención (para no ser obvia), o ser aplicable industrialmente no se ha examinado con respecto de:

[ ] la solicitud internacional completa,

[X] las reivindicaciones Nos. 46-49 (Con respecto a la aplicabilidad industrial)

porque:

[X] la solicitud internacional, o las reivindicaciones Nos. con respecto a la aplicabilidad industrial: 46-47 (parcialmente) y 48-49 (completamente) se refieren a la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especificar*):

ver hoja separada

[ ] la descripción, reivindicaciones o dibujos (elementos particulares indicados abajo) o las reivindicaciones Nos. no son claros de manera que no puede formar una opinión importante (*especifique*):

[ ] las reivindicaciones, o las reivindicaciones Nos. son así inadecuadamente soportadas por la descripción de manera que no puede formar una opinión importante.

[ ] no se ha establecido reporte internacional de búsqueda para la solicitud completa o para las reivindicaciones Nos.

[ ] el listado de secuencias de aminoácidos y/o nucleótidos no cumple con el estándar proporcionado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que:

la forma escrita [ ] no se ha publicado
[ ] no cumple con el estándar

la forma legible en computadora [ ] no se ha publicado
[ ] no cumple con el estándar

[ ] las tablas con relación al listado de secuencia de nucleótido y/o aminoácido, si sólo está en forma legible en computadora, no cumple con los requerimientos técnicos proporcionados en el Anexo C-bis en las Instrucciones Administrativas.

[ ] ver hoja separada para detalles adicionales.

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional No.
PCT/US2005/032196

09531

Recuadro No.V. Declaración razonada bajo la regla 43 bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, etapa inventiva o la aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que soportan tal declaración

1. DECLARACION.

Novedad (N)	Reivindicaciones	3,5-7,9-10,20-49	Si:
	Reivindicaciones	1,2,4,8,11-19	No:
Etapa Inventiva (EI)	Reivindicaciones		Si:
	Reivindicaciones	1-49	No:
Aplicación industrial (AI)	Reivindicaciones	1-45	Si:
	Reivindicaciones		No:

2. CITAS Y EXPLICACIONES

ver hoja separada

Recuadro No. VIII. Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

Se hacen las siguientes observaciones sobre la claridad de las reivindicaciones, descripción y dibujos o en la cuestión si las reivindicaciones están ampliamente soportadas en la descripción:

Ver Hoja separada

SECCION III

Las reivindicaciones 46-47 (parcialmente, con respecto a un método in vivo) y las reivindicaciones 48-49 (completamente) se refieren a una materia objeto considerada por esta Autoridad para cubrirse por las condiciones de la Regla 67.1(iv) PCT. En consecuencia, no podrá realizarse opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) PCT).

SECCION V

1 ARTE PREVIO

D1: Myers K A et al: "Targeting immune effector molecules to human tumor cells through genetic delivery of 5T4-specific scFV fusion proteins" Cancer Gene Therapy, Norwalk, CT, US, vol. 9, no. 11, Noviembre 2002 (11-2002), páginas 884-896, XP009007160 ISSN: 0929-1903 (citado en la solicitud)

D2: WO 98/55607 A2 (Kingsman Susan Mary et al) 10 diciembre 1998 (10-12-1998) (citado en la solicitud)

D3: BASE DE DATOS Geneseq [En línea] 15 marzo 1999 (15-03-1999), "Anti-5T4 single Caín antibody 5T4Sab1". Recuperado del EBI no. de acceso GSN:AAW86003 no. de acceso a la base de datos AAW86003

D4: US2004/082764A1 (Kunz Arthur et al) 29 abril 2004 (29-04-2004) (citado en la solicitud)

D5: Sievers E L et al: "Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: A phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate" BLOOD, vol. 93, no. 11, 1 june 1999 (01-06-1999), páginas 3678-3684, XP002370115 ISSN: 0006-4971 (citado en la solicitud)

1.1 El documento D1 describe un anticuerpo anti-5T4 humanizado, quimérico, que comprende un scFv de murino fusionado a IgG1 Fc humano. Esta proteína de fusión scFv-HigG1 es capaz de dirigir la lisis de líneas de célula de tumor humano que expresan 5T4 a través de la citotoxicidad de célula dependiente del anticuerpo, lo que indica su potencial como una terapia de gen para cánceres humanos (Resumen). D1 también menciona el uso de anticuerpos direccionados a antígenos asociados con tumor ligados a un fármaco de citotoxina, por ejemplo caliqueamicina, en el tratamiento del cáncer (página 884, columna del lado derecho, párrafo 1).

1.2 El documento D2 describe dos anticuerpos anti-5T4 humanizados que comprenden un scFv de murino fusionados a ya sea IgG1 Fc humano o IgE1 humano (ejemplos 1, 12 y 13, Figura 1b). El documento D3 describe la secuencia de aminoácido codificada por el scFv-IgG ADNc, 5T4Sab1, del documento D3. Los aminoácidos 23-142 de esta secuencia son 100% idénticos a los aminoácidos 1-120 de la SEQ ID NO: 2 de la presente solicitud. Los aminoácidos 158-264 son 86% idénticos a la SEQ ID NO: 17. Los CDR son 100% idénticos a los CDR de la SEQ ID NO: 17 y 18.

1.3 El documento D4 describe un conjugado de anticuerpo anti-CD22/caliqueamicina (CMC-544) obtenido a través de la conjugación de un anticuerpo anti-CD22 humanizado para N-hidroxisuccinimida del ácido caliquamicina dimetil hidracida 4-(4-acetilfenoxi)butanoico (Ejemplos 1-3). CMC-544 se mostró para ser efectivo en un modelo de ratón in vivo de linfoma de célula B (Ejemplos 6, 8).

1.4 El documento D5 describe el uso médico de un conjugado anticuerpo anti-CD33/fármaco, que consiste de un anticuerpo anti-CD33 humanizado ligado a la calicoamicina, para tratar pacientes con leucemia mieloide aguda positiva de CD33 liberada o refractoria (Resumen).

2 NOVEDAD (Art. 33(2) PCT)

2.1 No obstante que la afinidad de enlace del anticuerpo anti-5T4 humanizado, quimérico, scFv-HigG1, no se menciona explícitamente en D1, ya que la afinidad de enlace del anticuerpo monoclonal del cual se deriva es 1.85 x 10^{-11}M y aquellos de los otros constructos scFv son 7.90 x 10^{-10} M y 1.24 x 10^{-9} M, se asume que esta afinidad de enlace es de alrededor de 10^{-9} hasta 10^{-11} M. Por lo tanto, cae dentro del alcance de la reivindicación 1(a) y el documento D1 anticipa la novedad de las reivindicaciones 1, 2 y 4. Adicionalmente, debido a las definiciones funcionales en la reivindicación 1(e)-(h), los anticuerpos quiméricos de ambos documentos D1 y D2 caen dentro del alcance de la reivindicación 1 (e)-(h).

2.2 El anticuerpo anti-5T4 humanizado, quimérico, del documento D2 comprende una secuencia de aminoácidos (Documento D3, AA 23-142) que es 100% idéntica a la SEQ ID NO: 2, por lo tanto la reivindicación 8 no es novedosa sobre el documento D2 y D3. También los CDR de este anticuerpo son 100% idénticos a aquellos de las SEQ ID NOs:17 y 18, y la región de estructura, no obstante que es murina, comprende residuos de una región de estructura de anticuerpo humana. Por lo tanto las reivindicaciones 11-18 no parecen ser novedosas sobre los documentos D2 y D3.

2.3 El anticuerpo anti-5T4 humanizado, quimérico del documento D2 comprende una secuencia de aminoácidos (Documento D3, AA 158-264) que es 86% idéntica a la SEQ ID NO: 17, por lo tanto la reivindicación 19 no es novedosa sobre el documento D2 y D3.

2.4 El arte previo no describe ningún conjugado anticuerpo anti-5T4/fármaco, de esta manera las reivindicaciones 29-49 parecen ser novedosas.

2.5 En resumen, las reivindicaciones 3, 5-7, 9-10 y 20-49 son novedosas, no obstante que la presente solicitud no reúne los criterios del Artículo 33(1) PCT, debido a que la materia objeto de las reivindicaciones 1, 2, 4, 8 y 11-19 no es nueva en el sentido del Artículo 33(2) PCT.

3 ETAPA INVENTIVA (Artículo 33(3) PCT)

3.1 El documento D1 se aprecia como el arte previo más cercano para la materia objeto de las reivindicaciones 3, 5-7, 9-10 y 20-49.

3.2 Las reivindicaciones 3, 5-7, 9-10 y 20-28 difieren del documento D1 en que el anticuerpo anti-5T4 humanizado o quimérico comprende una región constante de cadena ligera kappa humana (reivindicación 3) o tienen una secuencia diferente (5-7, 9-10 y 20-28). El efecto de las diferencias de la materia objeto de las reivindicaciones 3, 5-7, 9-10 y 20-28 sobre el arte previo no se conoce. El problema a solucionarse puede, por lo tanto, apreciarse como proporcionar un anticuerpo 5T4 quimérico o humanizado alternativo.

3.3 Las soluciones como en las reivindicaciones 3, 5-7 y 20-22 no solucionan el problema planteado, ya que los anticuerpos no están suficientemente definidos (ver 5.3). Sólo los anticuerpos de los cuales las regiones variables de cadena pesada y ligera completas se definen pueden considerarse que tienen las características y propiedades de los anticuerpo ejemplificados en la solicitud. De esta manera, sólo los anticuerpos bien definidos solucionan el problema. Sin embargo, aún si los anticuerpos estuvieran bien definidos, como en las reivindicaciones 9-10 y 23-28, todavía estarían sin inventiva, ya que sin efecto sorprendente, estos caen dentro de las habilidades de rutina de aquellos expertos en la técnica y únicamente solucionan un problema estándar.

3.4 La reivindicación 29 difiere del documento D1 en que la citotoxicidad del anticuerpo anti-5T4 humanizado o quimérico no se debe a la citotoxicidad de célula dependiente del anticuerpo pero se debe a un fármaco enlazado al anticuerpo. El efecto de esta diferencia no se conoce. El problema a solucionarse puede, por lo tanto, apreciarse como proporcionar un constructo de anticuerpo 5T4 quimérico o humanizado alternativo. La solución de la reivindicación 29 no se considera como que involucra una etapa inventiva, ya que es meramente una solución arbitraria. Si pudiera atribuirse un efecto particular al conjugado anticuerpo/fármaco de la reivindicación 29, entonces todavía no sería inventivo, ya que el documento D1 ya menciona el ligado de anticuerpos dirigidos a antígenos asociados con el tumor con un fármaco citóxico, por ejemplo, caliqueamicina, y el uso de estos conjugados anticuerpo/fármaco en el tratamiento del cáncer. Por otro lado, los ejemplos de la producción de conjugados anticuerpo/fármaco (caliqueamicina) y su uso en el tratamiento de linfoma o leucemia, pueden encontrarse en los documentos D4 y D5. el mismo razonamiento aplica para el uso de conjugados anti-5T4 anticuerpo/fármaco quiméricos o humanizados de conformidad con los métodos de las reivindicaciones 46-49, por lo tanto las reivindicaciones también carecen de una etapa inventiva.

3.5 Las reivindicaciones dependientes 31-45 no parecen contener ninguna característica adicional que, en combinación con las características de las reivindicaciones a las que se refieren, involucren una etapa inventiva ya que la materia objeto cae dentro del conocimiento y la habilidad de la persona experta y no proporciona un efecto sorprendente.

3.6 La solución como en la reivindicación independiente 30 no soluciona el problema colocado, ya que el anticuerpo no se define suficientemente 8ver 5.1-5.3). Sin embargo, aún si el anticuerpo fuera bien definido, como en las reivindicaciones 31-45, todavía no sería inventivo por las mismas razones como bajo 3.4 y 3.5.

3.7 En vista de lo anterior, la presente solicitud no reúne los requerimientos del Artículo 33(1)PCT, debido a que la materia objeto de las reivindicaciones 3, 5-7, 9-10 y 20-49 no involucra una etapa inventiva en el sentido del Artículo 33(3)PCT.

4 Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 46-49 en la pregunta de que si es industrialmente aplicable, no existen criterios unificados en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaicones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como aplicable industrialmente la materia objeto de reividnicaciones al uso de un compuesto en un tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para su primer uso en un tratamiento médico y el uso de tal compuesto para la manufactura de un medicamento para un tratamiento médico nuevo.

SECCION VIII

5 CLARIDAD Y SOPORTE (Art. 6 PCT)

5.1 La materia objeto de la reivindicación 1 no se define claramente, ya que la reivindicación 1(d) intenta definir el anticuerpo en términos del resultado a alcanzarse "se enlaza específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de enlace mayor a la afinidad de enlace del anticuerpo anti-5T4 murino H8". No obstante, las características técnicas necesarias para alcanzar este resultado o función no se proporcionan. También la definición funcional en 1(e), "dirige específicamente las células que expresan 5T4 in vivo", no proporciona las características técnicas para distinguir de anticuerpo anti-5T4 quiméricos o humanizados que dirigan específicamente las células que expresan 5T4 en general o sólo in vitro. Sin embargo, si aquellas definiciones se combinaran con las características estructurales (secuencias) de las regiones variables de cadena pesada y ligera (ver 5.3), la materia objeto de la reivindicación 1 sería clara.

5.2 Aplica el mismo razonamiento para el conjugado anticuerpo/fármaco de la reivindicación 30.

5.3 En las reivindicaciones dependientes 2-8, 11-22 los anticuerpos están, además, definidos por características estructurales adicionales, sin embargo, no se definen estructuralmente de forma completa y por lo tanto todavía carecen de claridad por las siguientes razones:

Un anticuerpo se hace estructuralmente de dos cadenas ligeras y dos pesadas y la combinación de las regiones variables de cadena pesada y ligera confiere la especificidad de enlace al antígeno. Las CDR en combinación con ciertos residuos de la estructura y la disposición relativa de los CDR determina la especificidad enlazada al antígeno. La estructura, adicionalmente, tiene influencia sobre la estabilidad del anticuerpo. En general, la combinación simple de las secuencias CDR de un anticuerpo con la secuencia de estructura de un segundo no es suficiente para mantener el reconocimiento del antígeno. De esta manera, para definir un anticuerpo estructuralmente la secuencia completa de las regiones variables de cadena pesada y ligera deberán especificarse. Sin embargo, las reivindicaciones 2-8, 11-22 se refieren a anticuerpos anti-5T4 que sólo se definen estructuralmente por sus regiones constantes (reivindicaciones 2-6), por una o más CDR (reivindicaciones 11-18) o por la cadena ya sea pesada o ligera (reivindicaciones 7-8, 19-22).

Por lo tanto, las reivindicaciones 1-8, 11-22 y 30 se refieren a un número grande de posibles anticuerpos, para los cuales no es posible que tengan todos las propiedades de los anticuerpos como se ejemplifica y así las reivindicaciones 1-8, 11-22 y 30 carecen de claridad y soporte.

5.4 Adicionalmente, los siguientes términos son vagos y convierten a las reivindicaciones en no claras: "al menos una cadena ligera o al menos una cadena pesada" (ver 5.3; reivindicaciones 1 y 11), "dominio" (sólo parte de una cadena; ver 5.3, reivindicaciones 1 y 30), "fragmento" (no todos los fragmentos son funcionales; reivindicaciones 1-28, 46 y 48), "regiones de estructura que comprenden residuos de una región de estructura de anticuerpo humana" (reivindicación 11), "secuencia de consenso" (reivindicación 12), "enlazado indirectamente" (reivindicaciones 29, 46 y 48), "derivados" (reivindicación 45), "agente terapéutico" (reivindicaciones 48-49), los diferentes "agentes", "inhibidores" y el "ácido nucleico terapéutico" de las reivindicaciones 37 y 39.

5.5 La reivindicación 47 intenta definir la materia objeto en términos del resultado a alcanzarse, "en donde el fármaco se interna en una célula objetivo", que únicamente aumenta para establecer el problema fundamente, sin proporcionar las características técnicas necesarias para alcanzar este resultado. Por lo tanto, la reivindicación 47 carece de claridad y soporte.

5.6 Por otro lado, la solicitud carece de soporte para el uso médico de un conjugado anti-5T4/caliqueamicina en combinación con un segundo agente terapéutico (reivindicación 49).

PATENT COOPERATION TREATY

005/041

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

CAWLEY, Thomas, A., Jr.
Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP
P.O. Box 10500
McLean, VA 22102
United States of America

Date of mailing (day/month/year)	
24 March 2006 (24.03.2006)	
Applicant's or agent's file reference	**IMPORTANT NOTIFICATION**
40000/317753	
International application No.	**International filing date (day/month/year)**
PCT/US2005/032196	09 September 2005 (09.09.2005)

1. The following indications appeared on record concerning:

[X] the applicant [X] the inventor [ ] the agent [ ] the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
WIDOM, Angela, M. 19 Cherokee Road Acton, MA 01720 United States of America		
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

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	State of Nationality	State of Residence
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:
The person identified in Box 1 should be deleted from the records.

4. A copy of this notification has been sent to:

[X] the receiving Office
[X] the International Searching Authority
[ ] the International Preliminary Examining Authority
[X] the designated Offices concerned
[ ] the elected Offices concerned
[X] other: WIDOM, Angela, M.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Christina PARIANOU
Facsimile No. +41 22 338 7090	Telephone No. (41-22) 338 8699

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES

PCT
NOTIFICACION DEL REGISTRO DE UN CAMBIO

(Regla 92bis.1 e Instrucciones Administrativas, Sección 422 del PCT)

De la OFICINA INTERNACIONAL

Para:

CAWLEY, Thomas, A, Jr.
Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP
P.O. Box 10500
McLean, VA 22102
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Fecha de Envío (día/mes/año) 24 MARZO 2006 (24.03.2006)	
Referencia de registro del solicitante o mandatario 40000/317753	NOTIFICACION IMPORTANTE
Solicitud Internacional No. PCT/US2005/032196	Fecha de presentación Internacional (día/mes/año) 09 Septiembre 2005 (09.09.2005)

1. las siguientes indicaciones aparecen en el registro que se refiere a:

[X] El solicitante [X] El inventor [ ] El agente [ ] El Representante común

Nombre y Dirección	Estado de Nacionalidad	Estado de Residencia
WIDOM, Angela, M. 19 Cherokee Road Acton, MA 01720 ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	No. Teléfono	
	No. Fax.	
	No. De teleimpresora	

2. La oficina internacional notifica por la presente que se ha registrado el siguiente cambio que se refiere a:

[ ] La persona [ ] El nombre [ ] La dirección [ ] La nacionalidad [ ] La residencia

Nombre y dirección	Estado de Nacionalidad	Estado de Residencia
	No. Teléfono	
	No. Fax.	
	No. de teleimpresora	

3. Observaciones Adicionales si las hay:

La persona identificada en el recuadro 1 deberá eliminarse de los registros

4. Una copia de esta notificación se ha enviado a:	
[X] La oficina receptora [X] La Autoridad de Búsqueda Internacional [ ] La Autoridad del Examen Preliminar Internacional	[X] Las oficinas designadas relacionadas [ ] Las oficinas elegidas relacionadas [X] Otras: WIDOM, Angela, M
La Oficina Internacional de WIPO 34, Chemin des Colombettes 1211 Ginebra 20, Suiza Fax No. + 41 22 338 7090	Funcionario Autorizado (Rúbrica) Christina PARIANOU Teléfono. No. (41-22) 338 9999

Forma PCT/IB/306 (Marzo 1994)

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

CAWLEY, Thomas, A., Jr.
Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP
P.O. Box 10500
McLean, VA 22102
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 23 January 2006 (23.01.2006)	
Applicant's or agent's file reference 40000/317753	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2005/032196	International filing date *(day/month/year)* 09 September 2005 (09.09.2005)
International publication date *(day/month/year)* Not yet published	Priority date *(day/month/year)* 10 September 2004 (10.09.2004)
Applicant WYETH et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. *(If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. *(If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
10 September 2004 (10.09.2004)	60/608,494	US	19 December 2005 (19.12.2005)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer

Clemente Rodolfo

Facsimile No. +41 22 338 70 90
Telephone No. +41 22 338 84 56

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

0054/3

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl: A61K 47/48; C07K 16/30; C07K 16/46; A61K 39/395; A61P 35/00.
22) Fecha de solicitud:	(71)Solicitante(s) WYETH
(30) Prioridad (31) *No.* 60/608,494 32) *Fecha* 10/09/04 (33) *País* US	(72) Inventor(es) BOGHAERT, Erwin, R DAMLE, Nitin, K Otros
	(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
(85) Fecha límite inicio fase nacional: *10/04/07* (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 09/09/05 No. de solicitud PCT/US2005/032196	(87) Publicación Internacional Fecha: 23/03/06 N° publicación: WO 2006/031653

(54) Título: **ANTICUERPOS ANTI-5T4 HUMANIZADOS Y CONJUGADOS DE ANTICUERPOS ANTI-5T4/CALICUEAMICINA**

Reivindicación(es):

1. Un anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado que comprende por lo menos una cadena liviana o por lo menos una cadena pesada, o un fragmento quimérico humanizado de las mismas, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo
(a) liga específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de ligado de por lo menos cerca 1 x 10^{-7} M a cerca de 1 x 10^{-12} M;
(b) liga específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de ligado mayor que 1 x 10^{-11} M;
(c) liga específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de ligado mayor que 5 x 10^{-11} M;
(d) liga específicamente al antígeno 5T4 humano con una afinidad de ligado mayor que una afinidad de ligado del anticuerpo anti-5T4 de H8 de murina que liga al antígeno 5T4 humano;
(e) objetiva específicamente células que expresan 5T4 in vivo;
(f) compiten en cuanto al ligado al antígeno 5T4 humano con un anticuerpo de cualquiera una de (a)-(e);
(g) liga específicamente a un epítopo ligado por cualquiera uno de (a)-(e); o
(h) comprende un dominio de ligado de antígeno de cualquiera uno de (a)-(e).

Retiro folios 544 y 545
"Tarjetas"

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-023891- -00000-0000
Fec: 2007-05-04 16:39:31 Dep: 2000 NUEVAS SOLICITUDES
Cla: 11 PATENTES
Sub: 3/0 NACIONALES
Act: 411 PRESENTACION Folios: 454

345

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [✓] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de 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 [✓]

COMPLETA [✓] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha_____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

546

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO

REFERENCIA	Radicación No.	7 23991
	Solicitud internacional	PCT/US2005/032196
	Fecha inicio fase nacional	10/04/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	6557

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CEBALLOS DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 04 JUN. 2020
adpa11