

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



BT
OK
TGT

Organización y
Digitalización CSA Ltda

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

08 - 95703

EXPEDIENTE No.

TÍTULO "ANTICUERPOS ANTI-ST4 Y USOS DE LOS MISMOS"

1 de 2

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

SOLICITANTE WYETH

DOMICILIO NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS

APODERADO ALVARO CORREA ORDÓÑEZ
T.P. 20.281

BOGOTÁ, D. C., SEPTIEMBRE 10, 2008

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-095703- -00000-0000

Fecha: 2008-09-10 16:45:24 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 374

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

10 oct 2008

1

SOLICITUD DE :

☒ X

Patente de Invención

☒ X

Capítulo I.

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE (71)

Nombre: WYETH

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

Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América

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.10-62 Piso 6

Teléfono: 634 1500

Fax: 376 2211

E-Mail: office.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.; HAMANN, Philip, Ross; KHANDKE, Kiran; KUNZ, Arthur; MARQUETTE, Kimberly, A.; TCHISTIAKOVA, Lioudmila; GILL, Davinder y SREEKUMAR, Kodangattil
Dirección: 93 Ludlam Road, Monroe, NY 10950, Estados Unidos de América, 53 Stevenson Lane, Upper Saddle River, NJ 07458, Estados Unidos de América, 9 Jacobs Road, Thiells, NY 10984, Estados Unidos de América, 120 Eant Allison Avenue, Nanuet, NY 10954, Estados Unidos de América, 11 Jennifer Drive, New City, NY 10956, Estados Unidos de América, 66 Springfield Street, Apt. #1, Somerville, MA 02143, Estados Unidos de América, 19 Abbot Bridge Drive, Andover, MA 01810, Estados Unidos de América, 20 Charlotte Drive, Andover, MA 01810, Estados Unidos de América y 140 Parker Road, Plainsboro, NJ 08536, Estados Unidos de América, respectivamente

Nacionalidad o Domicilio: Domiciliados en Estados Unidos

5 PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/063685

Publicación Internacional No. WO/2007/106744

Fecha 09-MAR-07

Fecha 20-SEP-07

6

Título (54)

ANTICUERPOS ANTI-5T4 Y USOS DE LOS MISMOS

7

Clasificación Internacional (51)

C07K 16/00, A61K 39/395, C07K 14/47

8

Prioridad

SI ☒ X

NO ☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

10-MAR-06

23-FEB-07

(31) Número de Solicitud

60/781,346

60/891,248

9

Comprobante de pago No.

08-61891

Fecha 01-AGO-08

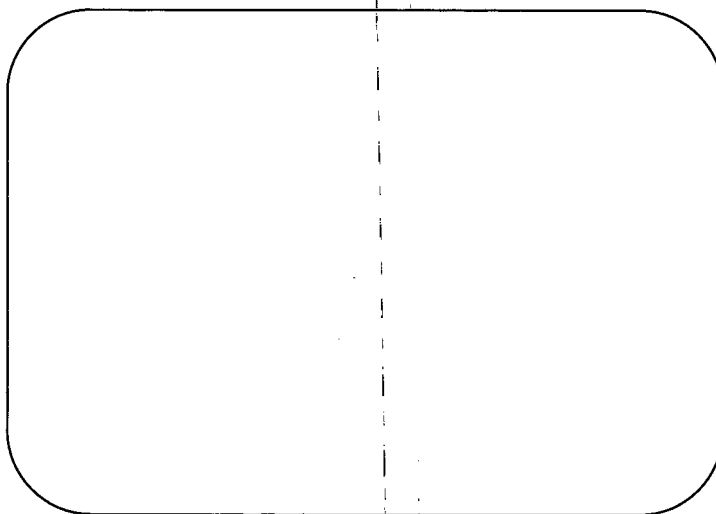
10

ANEXOS

- ☒ 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
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional 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.
- ☒ Otros: Varios solicitud internacional

11

FIGURA CARATERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquen

T.P. 20.281

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

2008 10 14

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 61,891
FECHA : AGOSTO 1 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-095703- -00000-0000

Fecha: 2008-09-10 16:45:24 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 374

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	79632243	01/08/2008	28,350,900.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 446/08 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 4 de agosto de 2008 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Poder otorgado por WYETH para su representación en relación con asuntos de propiedad industrial en Colombia. Certificación notarial suscrita por Michelle L. McGowan, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

EL PODER Y LA CERTIFICACIÓN NOTARIAL NO SE TRADUCEN POR ENCONTRARSE EN INGLÉS Y ESPAÑOL EN EL DOCUMENTO ORIGINAL.

(Fdo.) Michelle L. McGowan

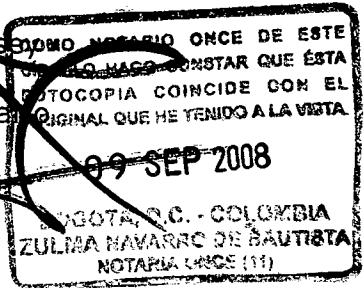
[Sello] MICHELLE L. McGOWAN
Notario Público, Estado de Nueva Jersey
No. 2108903
Habilitada en el Condado de Morris
La comisión expira el 9 de febrero de 2011

(Sello notarial en relieve)

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1. País: Estados Unidos de América
- 2. Este documento público ha sido firmado por: Michelle L. McGowan
- 3. actuando en calidad de: Notario Público de Nueva Jersey
- 4. lleva el sello/timbre de: Michelle L. McGowan, Notario Público



MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

5

CERTIFICADO

- 5. en Trenton, Nueva Jersey
- 6. el día 28 de julio de 2008
- 7. por R. David Rousseau, TESORERO DE NUEVA JERSEY
- 8. No. A334737
- 9. Sello/Timbre:

(Sello del Estado
de Nueva Jersey)

10. Firma

(Fdo.) R. David Rousseau

=====

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE OCTUBRE DE 1998

Maria Teresa Lara R.

María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia

ONCE DE ESTE
CULO HAGO CONSTAR QUE ESTA
TOCOPIA COINCIDE CON EL
ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
09 SEP 2008
BOGOTÁ, D.C. - COLOMBIA
ZULMA NAVARRO DE BAUTISTA
NOTARIA ONCE (11)

6

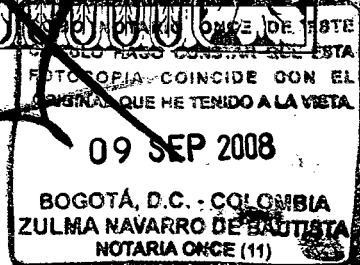
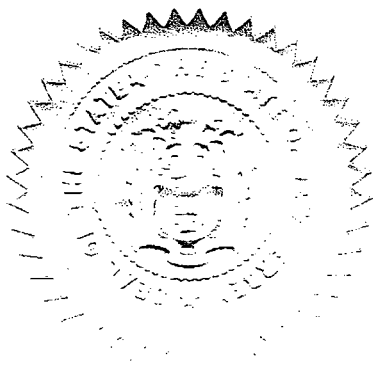
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MICHELLE L MC GOWAN
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MICHELLE L MC GOWAN, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 28TH DAY OF JULY 2008
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A334737
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



POWER OF ATTORNEY

The undersigned.

WYETH

with offices at

**Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America**

declares that it hereby grants to

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA**

all members of the law firm Baker & McKenzie Colombia S.A., with domicile at Av. 82 No. 10 - 62, 6Th floor, of Bogotá D. C., Colombia, and for so long as they remain members of the law firm, a full and sufficient Power of Attorney to obtain the protection of my (our) industrial property for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before administrative, and judicial authorities or persons, in all matters concerning the following: a) obtainment of patents, including filing of assignments, change of name or address, and at my (our) specific direction, voluntary cancellation, defending and filing of oppositions, cancellations, annulment and criminal actions, and in general the civil, criminal, and administrative processes relating to those rights.

I hereby ratify all lawful actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in

On the 25th day of July, 2008

Gale F. Matthews
Assistant Secretary

Signature of the person issuing the Power

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

WYETH

con oficinas en

**Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América**

declara por el presente que otorga a

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA**

todos miembros de la firma de abogados Baker & McKenzie Colombia S.A., con domicilio en la Av. 82 No. 10 - 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, y hasta tanto ellos continúen siendo miembros de la firma, poder amplio y suficiente para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial a, cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante autoridades o personas del orden administrativo y judicial, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes, incluyendo presentación de traspasos, cambio de nombre o dirección y bajo mi (nuestra) expresa(s) instrucción(es), cancelación voluntaria, defensa y presentación de oposiciones, cancelaciones, nulidades, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos.

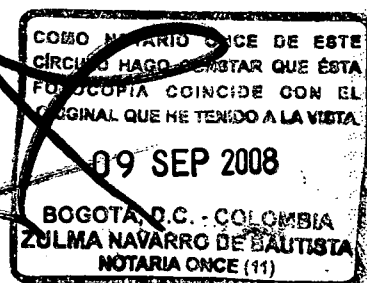
Igualmente, ratifico todo lo actuado en derecho hasta el momento en nombre de esta compañía por cualquiera de los mencionados apoderados en los casos mencionados.

Dado y firmado en

A los 25 días del mes de julio de 2008

Gale F. Matthews
Subsecretario

Firma de la persona que firma el Poder



NOTARIAL CERTIFICATION

On this 25th day of July
2008, the undersigned Notary

CERTIFIES

1. That **Gale F. Matthews**

set his hand on the foregoing document.

2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.

3. That the grantor has executed the foregoing document as

Assistant Secretary

of the judicial person **WYETH**

4. That the judicial person **WYETH**
having its home office in
Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America

is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.

6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:

Minutes of the Board of Directors Meeting held on May 24, 2008.

Michelle L. McGowan
Notary Public

MICHELLE L. McGOWAN
Notary Public, State of New Jersey
No. 2108903
Qualified in Morris County
Commission Expires Feb. 9, 2011

CERTIFICACION NOTARIAL

A los 25 días del mes de julio
de 2008, el suscrito Notario

1. Que **Gale F. Matthews**

suscribió de su puño y letra el documento que antecede.

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.

3. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

Subsecretario

de la persona jurídica **WYETH**

4. Que la persona jurídica **WYETH**
con sede en

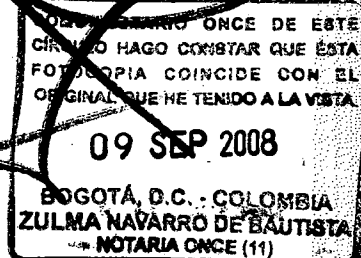
Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América

está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:
Actas de la reunión de la Junta Directiva celebrada el 24 de mayo de 2008.

El Notario Público



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

(19) ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
Oficina Internacional

OMP
PCT



(43) Fecha de Publicación Internacional:
20 de Septiembre de 2007 (20.09.2007)

(10) Número de Publicación Internacional:
WO 2007/106744 A3

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:
C07K 16/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2007/063685

(22) Fecha de Presentación Internacional:
09 de Marzo de 2007 (09.03.2007)

(25) Idioma Presentado: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Fecha de Prioridad:
60/781,346 10 de Marzo de 2006 (10.03.2006) US
60/891,248 23 de Febrero de 2007 (23.02.2007) US

(71) Solicitante: (para todos los Estados designados excepto US):
WYETH [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventor: e

(75) Inventor/Solicitante: (para US únicamente): **BOGHAERT**, Erwin, R.; 93 Ludlam Road, Monroe, NY 10950 (US). **DAMLE**, Nitin, K.; 53 Stevenson Lane, Upper Saddle River, NJ 07458 (US). **HAMANN, Philip, Ross**; 9 Jacobs Road, Thiells, NY 10984 (US). **KHANDKE, Kiran**; 120 Eant Allison Avenue, Nanuet, NY 10954 (US). **KUNZ, Arthur**; 11 Jennifer Drive, New City, NY 10956 (US). **MARQUETTE, Kimberly, A.**; 66 Springfield Street, Apt. #1, Somerville, MA 02143 (US). **TCHISTIAKOVA, Lioudmila**; 19 Abbot Bridge Drive, Andover, MA 01810 (US). **GILL, Davinder**; 20 Charlotte Drive, Andover, MA 01810 (US). **SREEKUMAR, Kodangattil**; 140 Parker Road, Plainsboro, NJ 08536 (US).

(74) Agente: **MEIGS, Julie, Broadus et al.**; Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP, P.O. Box 10500, McLean, VA 22102 (US).

(81) Estados Designados: (a menos que se indique de otro modo, para cada caso de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, 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) Estados Designados: (a menos que se indique de otro modo, para cada caso de protección regional disponible): patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), patente Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

+ con el reporte de búsqueda internacional
+ antes de la expiración del tiempo límite para enmendar las reivindicaciones y para ser vueltas a publicar en el caso de la recepción de las enmiendas
+ con parte del listado de secuencias de la descripción publicada separadamente en forma electrónica y disponible a petición de la Oficina Internacional

(88) Fecha de Publicación del Reporte de Búsqueda Internacional:

29 de Noviembre de 2007

Para códigos de dos letras y otras abreviaciones, referirse a "Notas de Guía de Códigos y Abreviaturas" que aparece al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta del PCT.

(54) Título: ANTICUERPOS ANTI-5T4 Y USOS DE LOS MISMOS

(57) Resumen:

Anticuerpos anti-5T4, conjugados de anticuerpo anti-5T4/fármaco, y métodos para preparar y usar los mismos.

WO 2007/106744 A3

WHAT IS CLAIMED:

1. An antibody that specifically binds human 5T4 antigen, wherein the antibody:
 - (a) comprises an antigen binding domain of murine A1, A2, or A3 antibodies;
 - (b) competes for 5T4 binding with murine A1, A2, or A3 antibodies;
 - (c) binds a 5T4 epitope bound by A1, A2, or A3 antibodies; or
 - (d) comprises a 5T4-binding fragment of an antibody of (a)-(c).
2. The antibody of claim 1, wherein the antibody is a chimeric antibody, a humanized antibody, a single chain antibody, a Fab fragment, a F(ab)₂ fragment, a Fv fragment, a tetrameric antibody, a tetravalent antibody, a multispecific antibody, a domain-specific antibody, a single domain antibody, or a fusion protein.
3. The antibody of claim 1, which is a murine monoclonal antibody.
4. The antibody of claim 1, wherein the antibody has a binding affinity for human 5T4 antigen of at least about 1×10^{-7} M to about 1×10^{-12} M.
5. The antibody of claim 1, wherein the antibody specifically targets 5T4-expressing cells *in vivo*.
6. The antibody of claim 1, wherein the heavy chain variable region comprises an amino acid sequence of residues 20-138 of SEQ ID NO:2, residues 19-135 of SEQ ID NO:6, residues 20-141 of SEQ ID NO:10, residues 1-119 of SEQ ID NO:49; or residues of a humanized A1, A2, or A3 heavy chain variable region.
7. The antibody of claim 1, wherein the light chain variable region comprises an amino acid sequence of residues 21-127 of SEQ ID NO:4, residues 23-130 of SEQ ID NO:8, residues 21-127 of SEQ ID NO:12; or residues of a humanized A1, A2, or A3 light chain variable region.

8. The antibody of claim 1, wherein the heavy chain variable region comprises an amino acid sequence of residues 20-138 of SEQ ID NO:2, and wherein the light chain variable region comprises an amino acid sequence of residues 21-127 of SEQ ID NO:4.
9. The antibody of claim 1, wherein the heavy chain variable region comprises an amino acid sequence derived from residues 19-135 of SEQ ID NO:6, and wherein the light chain variable region comprises an amino acid sequence derived from residues 23-130 of SEQ ID NO:8.
10. The antibody of claim 1, wherein the heavy chain variable region comprises an amino acid sequence derived from residues 20-141 of SEQ ID NO:10, and wherein the light chain variable region comprises an amino acid sequence derived from residues 21-127 of SEQ ID NO:12.
11. The antibody of claim 2, which is a chimeric or humanized anti-5T4 antibody.
12. The chimeric or humanized antibody of claim 11, which comprises constant regions derived from human constant regions.
13. The chimeric or humanized antibody of claim 12, wherein the human light chain constant region is derived from human kappa light chain constant region.
14. The chimeric or humanized antibody or antibody fragment of claim 12, wherein the human heavy chain constant region is derived from a human IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4 heavy chain constant region.
15. The chimeric or humanized antibody or antibody fragment of claim 14, wherein the human IgG4 heavy chain constant region comprises proline at position 241.
16. The chimeric or humanized antibody of claim 11, wherein the variable region of the at least one light chain or at least one heavy chain comprises:

- 12
- (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:4, 8, or 12, or one or more CDRs of the heavy chain variable region of SEQ ID NO:2, 6, or 10.

17. The chimeric or humanized antibody of claim 16, wherein the human residues are human framework residues selected from the group consisting of:

- (a) a human antibody heavy chain framework region selected from the group consisting of DP-21 (VH7), DP-54 (VH3-07), DP-47 (VH3-23), DP-53 (VH-74), DP-49 (VH3-30), DP-48 (VH3-13), 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);
- (b) a human antibody light chain framework region of a DPK24 subgroup IV germ line clone, a V κ III subgroup (DPK23, DPK22, DPK20, DPK 21), or a V κ I subgroup germ line clone (DPK9, DPK1, O2, DPK-7);
- (c) a consensus sequence of a heavy chain framework region of (a); or
- (d) a framework region that is at least 63% identical to a framework region of (a)-(c).

18. The chimeric or humanized antibody of claim 16 comprising at least two CDRs of any one of SEQ ID NOs:2, 4, 6, 8, 10, or 12.

19. The humanized antibody of claim 18, wherein the light chain comprises a variable region comprising at least two of three CDRs of any one of SEQ ID NOs:4, 8, or 12.

20. The humanized antibody of claim 19, wherein the light chain comprises a variable region comprising three CDRs of any one of SEQ ID NOs:4, 8, or 12.

13

21. The humanized antibody of claim 16, wherein the heavy chain comprises a variable region comprising at least two of three CDRs of any one of SEQ ID NOs:2, 6, or 10.

22. The humanized antibody of claim 21, wherein the heavy chain comprises a variable region comprising three CDRs of any one of SEQ ID NOs:2, 6, or 10.

23. The humanized antibody of claim 16, which comprises the CDRs of SEQ ID NOs:2 and 4, the CDRs of SEQ ID NOs:6 and 8, or the CDRs of SEQ ID NOs:10 and 12.

24. The chimeric or humanized antibody of claim 11, wherein the heavy chain variable region sequence comprises:

- (a) an amino acid sequence of residues 20-138 of SEQ ID NO:2;
- (b) an amino acid sequence that is at least 85% identical to residues 20-138 of SEQ ID NO:2;
- (c) an amino acid sequence of residues 19-135 of SEQ ID NO:6;
- (d) an amino acid sequence that is at least 86% identical to residues 19-135 of SEQ ID NO:6;
- (e) an amino acid sequence of residues 20-141 of SEQ ID NO:10;
- (f) an amino acid sequence that is at least 91% identical to residues 20-141 of SEQ ID NO:10;
- (g) an amino acid sequence of any one of SEQ ID NOs:49, 51, 52, 54, 56, 77, 78, 81, or 82;
- (h) an amino acid sequence that is at least 91% identical to SEQ ID NO:51;
- (i) an amino acid sequence that is at least 78% identical to SEQ ID NO:54;
- (j) an amino acid sequence that is at least 89% identical to SEQ ID NO:77;
- (k) an amino acid sequence that is at least 79% identical to SEQ ID NO:78;

- 14
- (l) an amino acid sequence that is at least 80% identical to SEQ ID NO:81; or
 - (m) an amino acid sequence that is at least 78% identical to SEQ ID NO:82;

25. The chimeric or humanized antibody of claim 11, wherein the light chain variable region sequence comprises:

- (a) an amino acid sequence of residues 21-127 of SEQ ID NO:4;
- (b) an amino acid sequence that is at least 94% identical to residues 21-127 of SEQ ID NO:4;
- (c) an amino acid sequence of residues 23-130 of SEQ ID NO:8;
- (d) an amino acid sequence that is at least 96% identical to residues 23-130 of SEQ ID NO:8;
- (e) an amino acid sequence of residues 21-127 of SEQ ID NO:12;
- (f) an amino acid sequence that is at least 98% identical to residues 21-127 of SEQ ID NO:12;
- (g) an amino acid sequence of any one of SEQ ID NOs: 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 79, 80, 83, or 84;
- (h) an amino acid sequence that is at least 83% identical to SEQ ID NO:60;
- (i) an amino acid sequence that is at least 93% identical to SEQ ID NO:70;
- (j) an amino acid sequence that is at least 85% identical to SEQ ID NO:76;
- (k) an amino acid sequence that is at least 85% identical to SEQ ID NO:76;
- (l) an amino acid sequence that is at least 88% identical to SEQ ID NO:79;
- (m) an amino acid sequence that is at least 84% identical to SEQ ID NO:80;
- (n) an amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO:83; or
- (o) an amino acid sequence that is at least 91% identical to SEQ ID NO:84.

- 13
26. An antibody/drug conjugate for drug delivery comprising:
- (a) an antibody according to claim 1; and
 - (b) a drug, which is directly or indirectly bound to the antibody.
27. The antibody/drug conjugate of claim 26, 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.
28. The antibody/drug conjugate of claim 27, wherein the therapeutic agent is a cytotoxin.
29. The antibody/drug conjugate of claim 26, 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.
30. The antibody/drug conjugate of claim 27, wherein the cytotoxin is an antibiotic.
31. The antibody/drug conjugate of claim 30, wherein the antibiotic is calicheamicin.
32. The antibody/drug conjugate of claim 31, wherein the calicheamicin is an N-acetyl derivative or disulfide analog of calicheamicin.
33. The antibody/drug conjugate of claim 32, wherein the calicheamicin is N-acetyl- γ -calicheamicin.
34. The antibody/drug conjugate of claim 26, wherein the drug is bound to the antibody via a linker.

35. The antibody/drug conjugate of claim 34, 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.
36. A method for delivering a drug to 5T4-expressing cells comprising contacting the cells with an antibody/drug conjugate comprising (i) an anti-5T4 antibody of claim 1, and (ii) a drug which is bound to the an anti-5T4 antibody directly or indirectly.
37. The method of claim 36, wherein the drug is internalized in a target cell.
38. 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) an anti-5T4 antibody of claim 1, and (ii) a therapeutic agent which is bound to the anti-5T4 antibody directly or indirectly.
39. The method of claim 38, wherein the anti-5T4 antibody/drug conjugate is an 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.
40. An antibody that specifically binds to a human 5T4 epitope comprising residues 173-252 and 276-355, excepting residues 213-214, of SEQ ID NO:87.
41. An antibody that specifically binds to a human 5T4 epitope comprising amino acids 276-355 of SEQ ID NO:87.
42. An antibody that specifically binds to a human 5T4 epitope comprising amino acids 83-163 of SEQ ID NO:87.

- 17
43. An antibody that specifically binds to cynomolgous monkey 5T4 having an amino acid sequence of SEQ ID NO:86.
44. An isolated 5T4 protein comprising:
- (a) an amino acid sequence of SEQ ID NO:85 or 86; or
 - (b) an amino acid sequence that is at least 95% identical to SEQ ID NO:85.
45. An antibody that specifically binds the isolated 5T4 protein of claim 44.
46. An isolated nucleic acid encoding an anti-5T4 heavy chain variable region comprising:
- (a) a nucleotide sequence of nucleotides 58-414 of SEQ ID NO:1;
 - (b) a nucleotide sequence of nucleotides 55-405 of SEQ ID NO:5;
 - (c) a nucleotide sequence of nucleotides 58-423 of SEQ ID NO:9;
 - (d) a nucleotide sequence encoding any one of SEQ ID NOs:48, 50, 53, or 55;
 - (e) a nucleotide sequence that is 89% identical to SEQ ID NO:50 when the query coverage is 100%;
 - (f) a nucleotide sequence that is 82% identical to SEQ ID NO:53 when the query coverage is 100%; or
 - (g) a nucleic acid that specifically hybridizes to the complement of any one of (a)-(d) under stringent hybridization conditions.
47. An isolated nucleic acid encoding an anti-5T4 light chain variable region comprising:
- (a) a nucleotide sequence of nucleotides 61-381 of SEQ ID NO:3;
 - (b) a nucleotide sequence of nucleotides 67-390 of SEQ ID NO:7;
 - (c) a nucleotide sequence of nucleotides 61-381 of SEQ ID NO:11;
 - (d) a nucleotide sequence encoding a humanized A1, A2, or A3 light chain variable region of any one of SEQ ID NOs: 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, or 75;
 - (e) a nucleotide sequence that is 84% identical to SEQ ID NO:59 when the query coverage is 100%;

- (f) a nucleotide sequence that is 86% identical to SEQ ID NO:69 when the query coverage is 100%;
- (g) a nucleotide sequence that is 85% identical to SEQ ID NO:75 when the query coverage is 100%; or
- (h) a nucleic acid that specifically hybridizes to the complement of any one of (a)-(d) under stringent hybridization conditions.

1/29

FIG. 1A

Murine A1 VH

ATGGATTGGCTGTGGAACTTGCTATTCTTGATGGCAGCTGCCCCAAAGTAT
CCAAGCACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTG
GAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACCTTCACAAAC
TTTGGAAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAGAGGGTTTAAAGTGGAT
GGGCTGGATAAACACCAACACTGGAGAGCCAGATATGCTGAAGAGTTCA
AGGACGGT (G/T) TGCCTTTTCTTTGGAAACCACTGCCAGCACTGCCTATTG
CAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAG
AGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTC
TCACAGTCTCTCA (SEQ ID NO:1)

MDWLNNLLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFN
PGMNVVKQGPGEGLKWMGWINTNTGEPYAEFFKGR (C/F) APSLETTASTAYL
QINNLIKNE DTATYFCARDWDGAYFFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:2)

Murine A1 VL

ATGAAGTCACAGACCCAGGTCTTCGTATTCTACTGCTCTGTGTGTCTGG
TGCTCATGGGAGTATTGTGATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCTTGTT
CAGCAGGAGACAGGGTGACCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGT
AATGATGTAGCTTGGTACCAACAGAAGCCAGGGCAGTCTCCTAAACTGTT
GATRAACTTTGCAACCAATCGCTACACTGGAGTCCCTAATCGCTTCACTG
GCAGTGGATATGGGACGGATTTCACCTTCACCATCAGCACTGTGCAGGCT
GAAGACCTGGCACTTTATTCTGTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCGTGGAC
GTTGGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA (SEQ ID NO:3)

MKSOTQVFVFLLLCVSGAHGSI VMTQTPKFLLVSA GDRVTITCKASQSVS
NDVANYQKPGQSPKLLINPATNRYTGVPNRFTGSGYGTDFTFITSTVQA
EDLALYFCQQDYSSPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:4)

2/29

FIG. 1B

Murine A2 VH

ATGGAATGGAGGATCTTTCTCTTCATCCTGTGAGGAAGTGCAGGTGTCCA
CTCCCAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTAGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGCGG
CTTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGATAACACTTTCAGTACTAT
GTTATAAGCTGGGTGAAGCAGAGAACTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGG
ACAGATTTATCCTGGAAGTAATAGTATTTATTACAATGAGAAGTTCAAGG
GCAGGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAG
CTCAGCAGGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAATGG
GGGTAAGTACGGCTTTGACTATTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCT
CCTCA (SEQ ID NO:5)

NEWKIFLFIISGTAGVHSQVQLQOSRPELVKPGASVKMSCKASGYTFDY
VISWVKQRTCGGLEWIGEIYFGSNSIYYNEKPKGRATLTADKSSSTAYMQ
LSSLTSEDSAVYFCAMGGNYGFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:6)

Murine A2 VL

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGT
CATAATGTTCAGAGGACAAATTGTTCTCAGCCAGTCTCCAGCAATCATGT
CTGCATCTCTAGGGGAACGGGTCACTTGACCTGCACTGCCAGCTCAAGT
GTAAATTCGAATTACTTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCC
CAAACTCTGGATTTATAGCACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTC
GCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGC
ATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCATCGTTC
CCCGCTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO:7)

NDPOVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLTQSPAISASLGERTVLTCTASSS
VNSNYLHWYQQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISS
MEAEADAATYYCHQYHRSPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:8)

3/29

FIG. 1C

Murine A3 VH

ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTTCTTTGTTGTTTTTATCAAGGTGT
GCATTGTGAGGTGCAGCTTGTGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTA
AAGGCTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAATACC
TAGCCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGAATGGGT
TGCTCGCATAAGGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACATATTATGCCGATT
CAGTGAAAGACAGGTTCAACATCTCCAGAGATGATTACAAAGCATGCTC
TATCTGCAAATGAACAACTTGAAAAGTGAAGACACAGCCATGTATT (G/A) CTG
TGTGAGACAGTGGGATTACGACGTCAGGGCTATGAACTACTGGGGTCAAG
GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:9)

MLLGLKWVFFVVFYQGVHCEVOLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNT
YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSML
YLOMNNLKTEDTAMY (C/Y) CVRQWDYDVRAMNYWGQGSVTVSS (SEQ ID
NO:10)

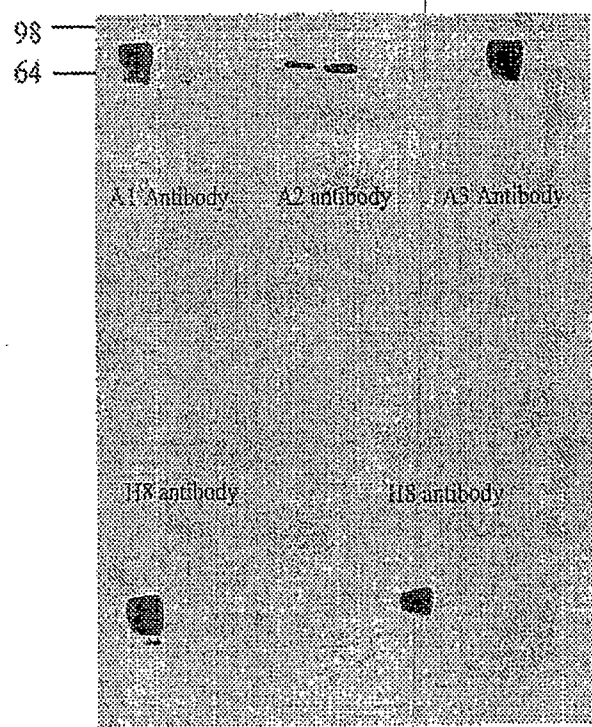
Murine A3 VL

ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGTATACATGTTGCTGTGGTTGTCTGG
TGTTGAAGGAGACATTGTGATGACCCAGTCTCACATATTCACTCCACAT
CAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGAT
ACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAACTACT
GATTIACCTGGGCATCCACCCGGCTCACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAG
GCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACCTCTCACCATTAGCAATGTGCAGTCT
GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTGAGCAATATAGCAGCTATCCGTACAC
GTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:11)

METHSCQVPVYMLLWLSGVEGDI VMTQSHIFMSTSVGDRV SITCKASQDVD
TAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRLTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQS
EDLADYFCQQYSSYPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:12)

4/29

FIG. 2



5/29

FIG. 3A

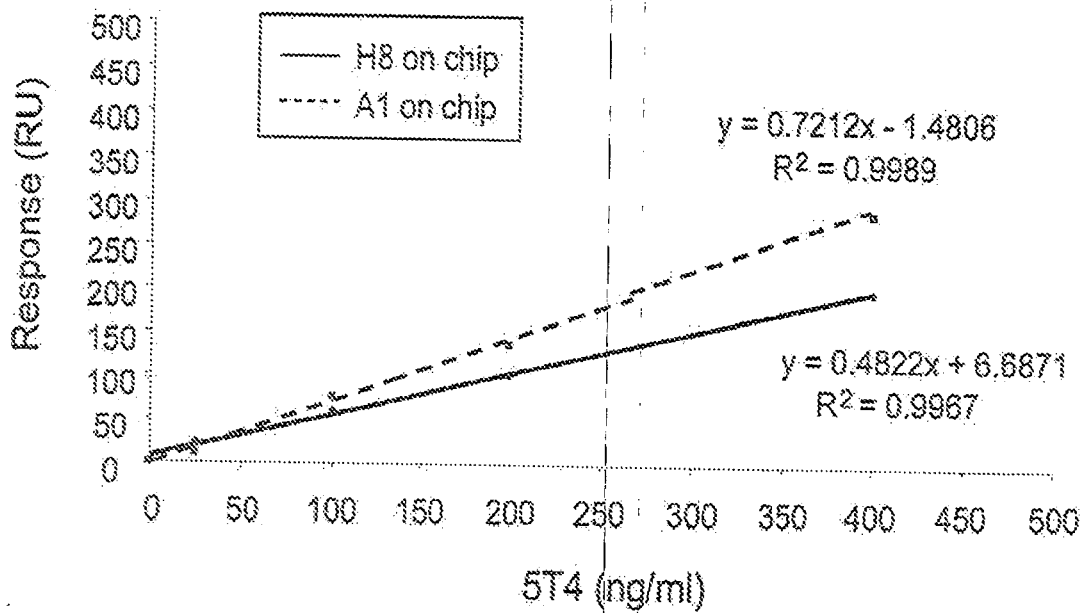
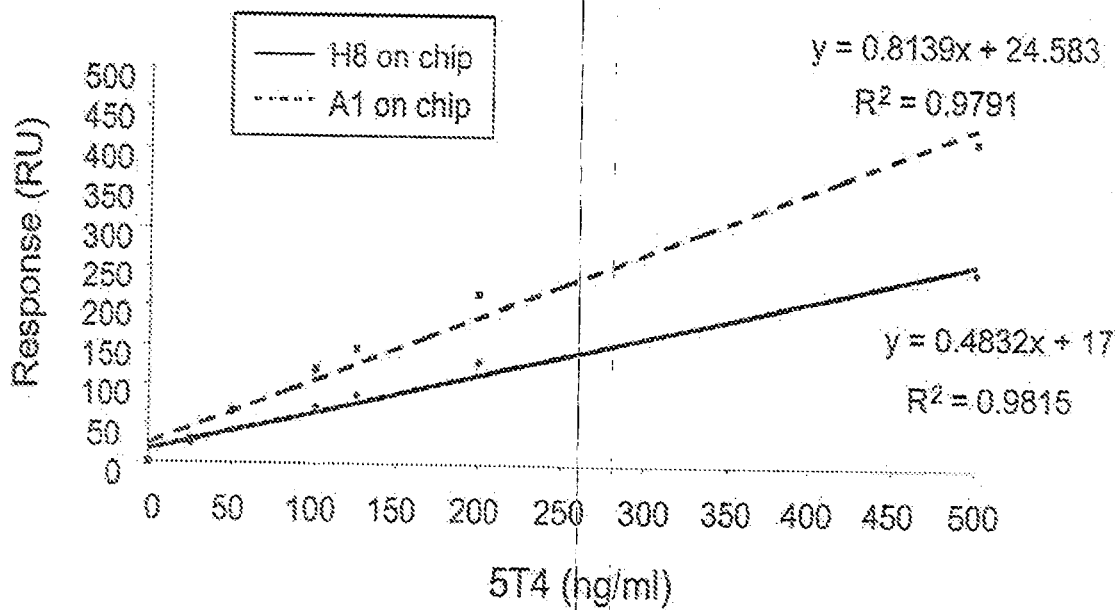


FIG. 3B



6/29

FIG. 4A

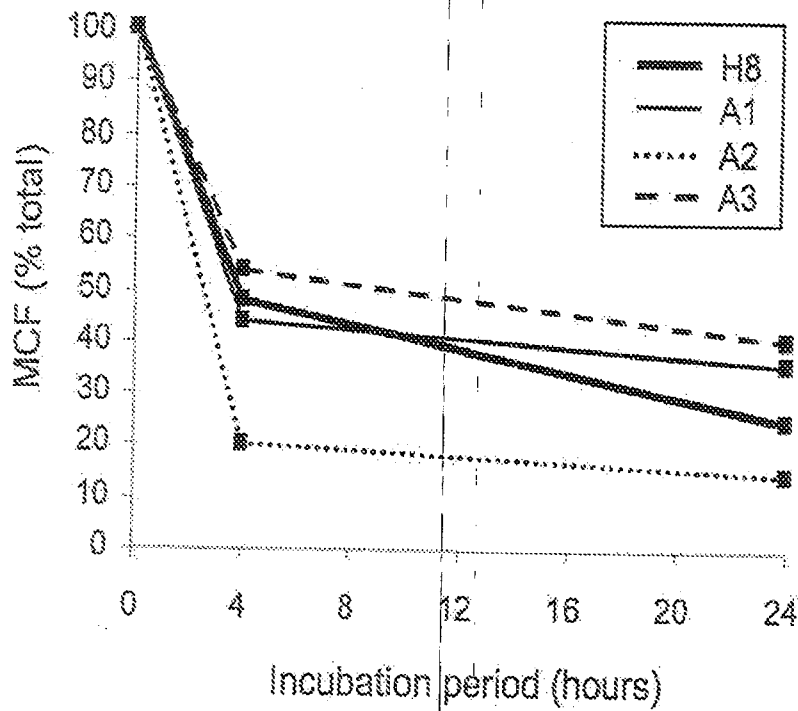
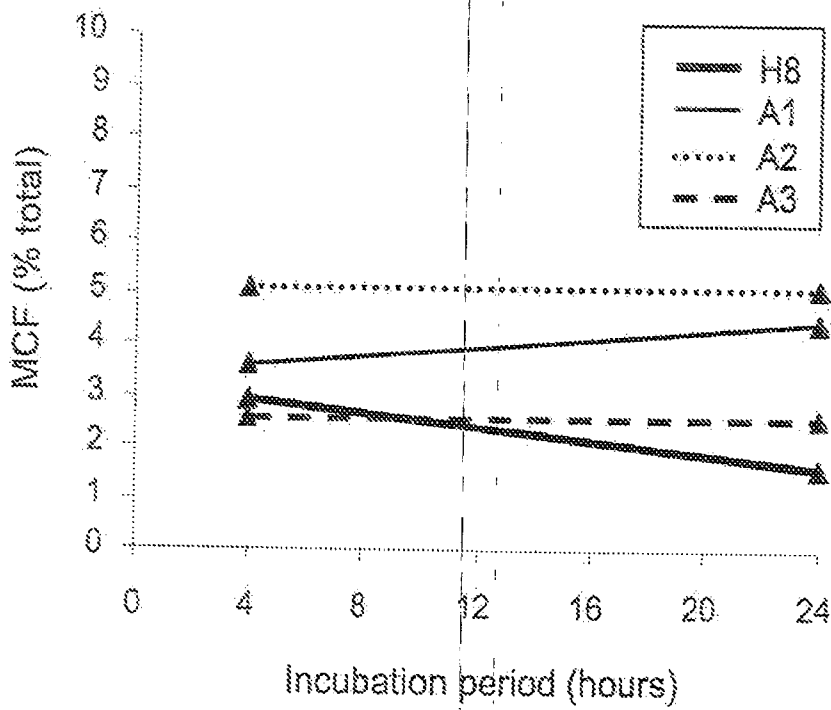


FIG. 4B



7/29

25

FIG. 4C

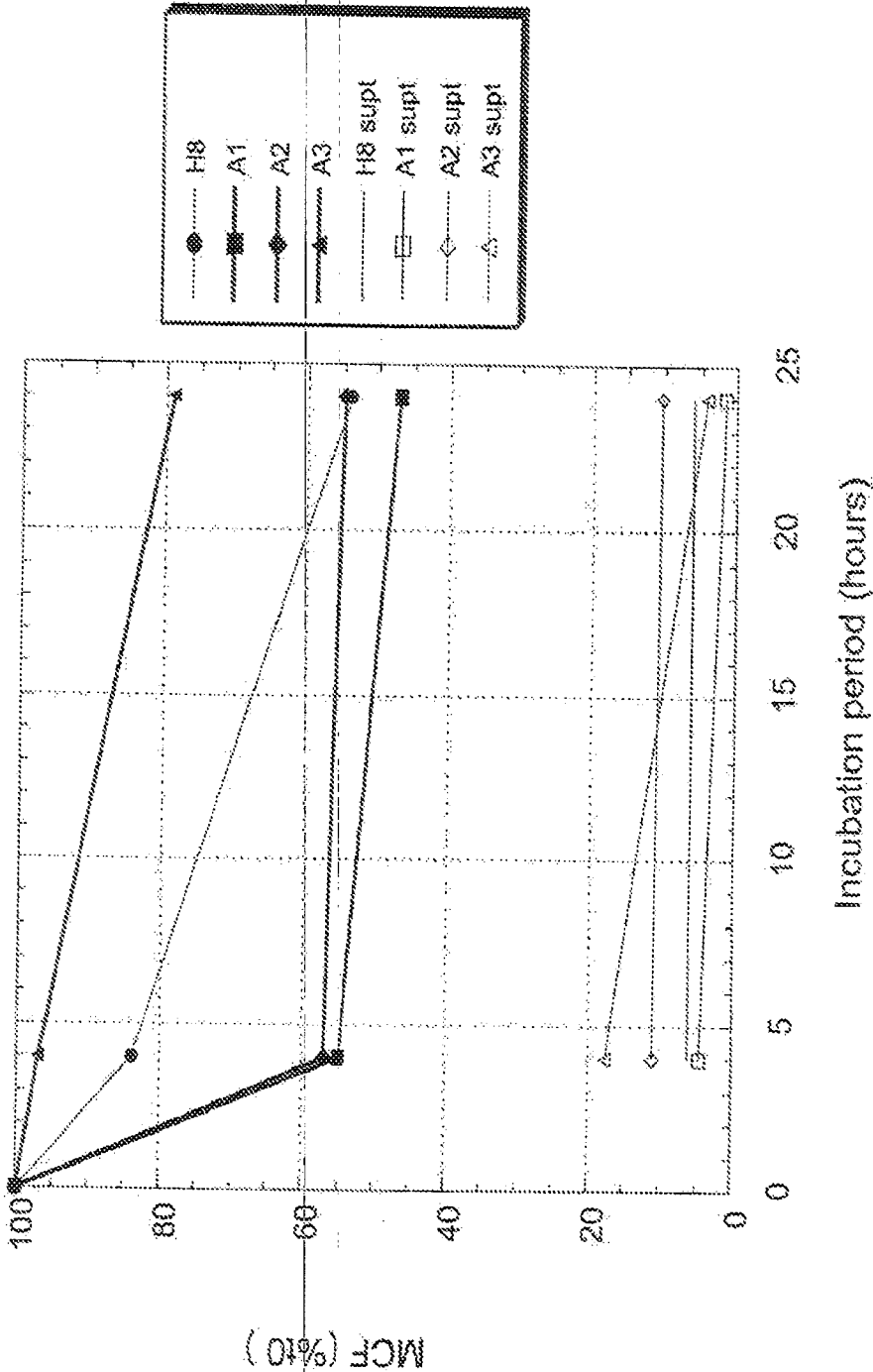
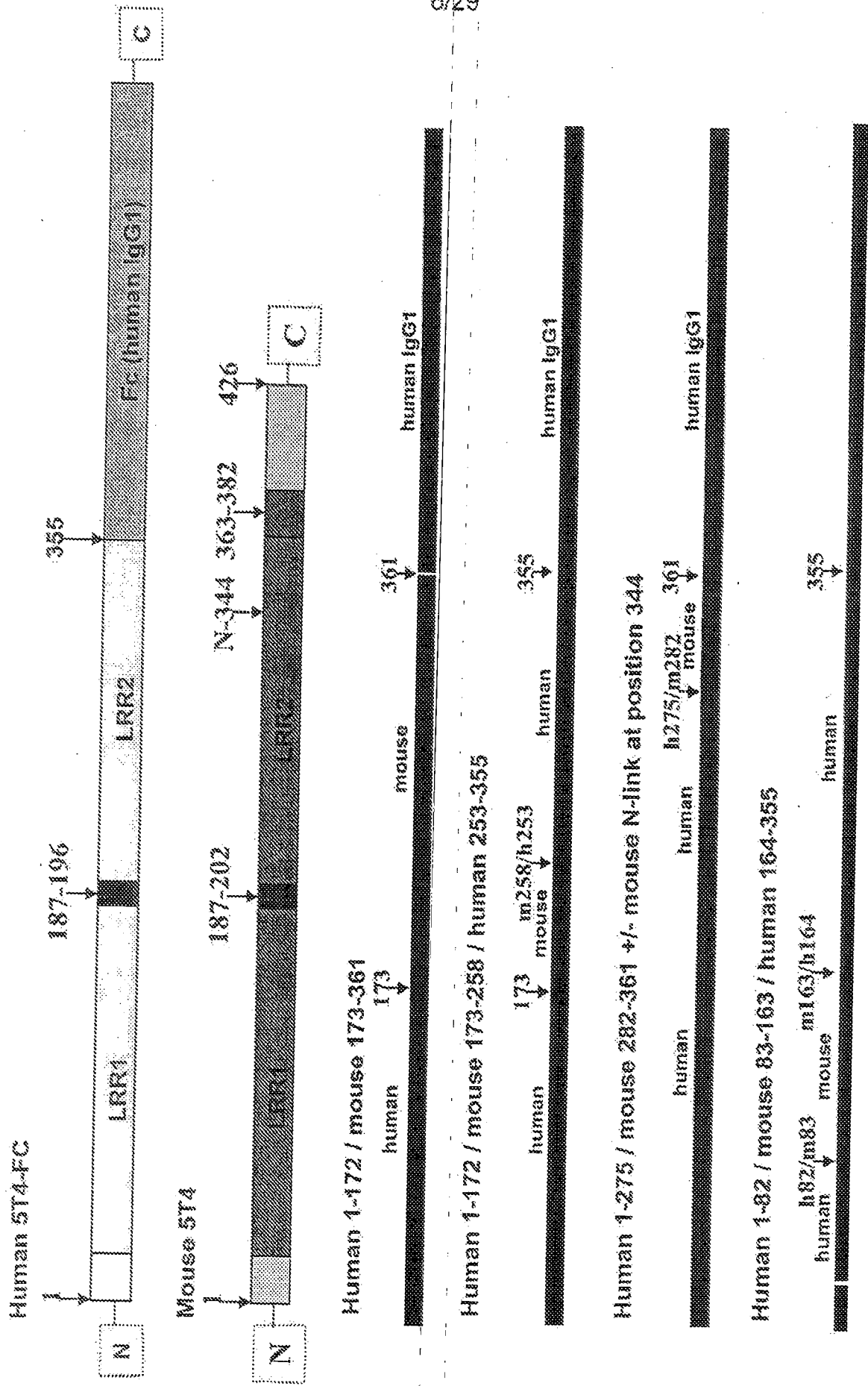
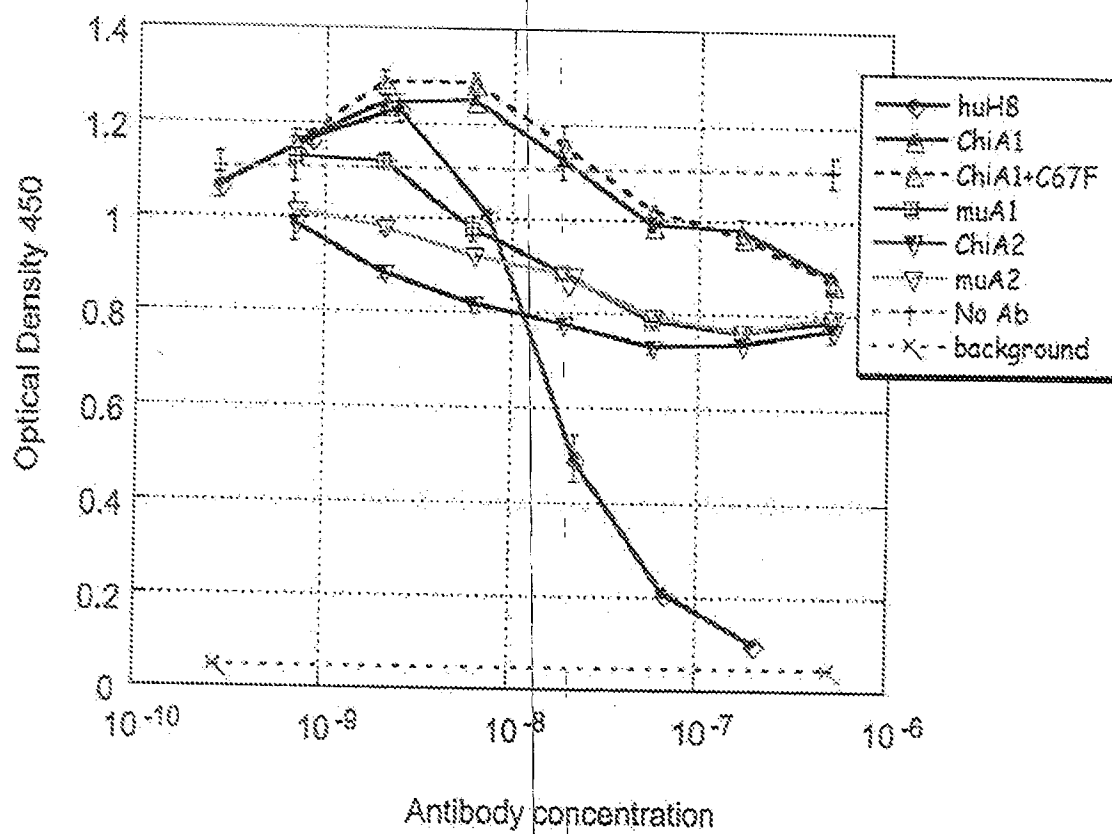


FIG. 5



9/29

FIG. 6A



10/29

FIG. 6B

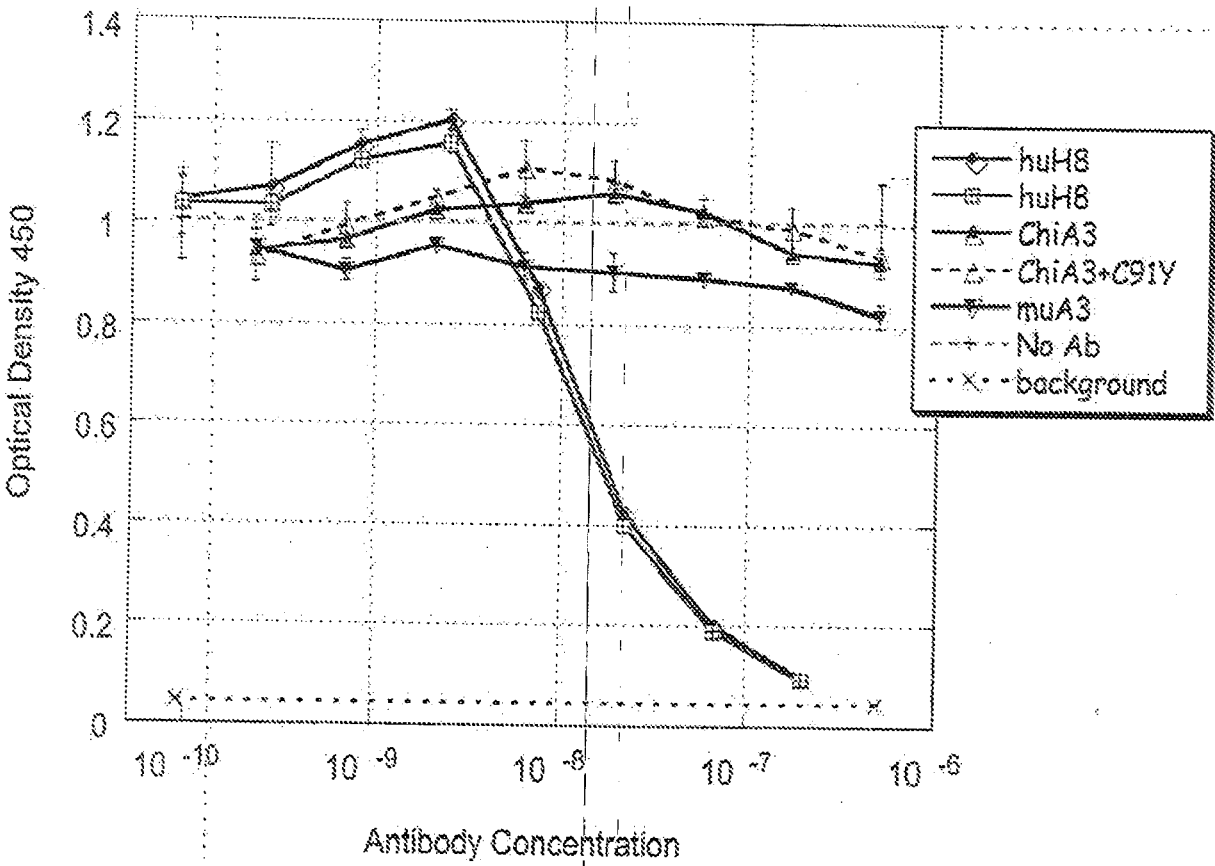
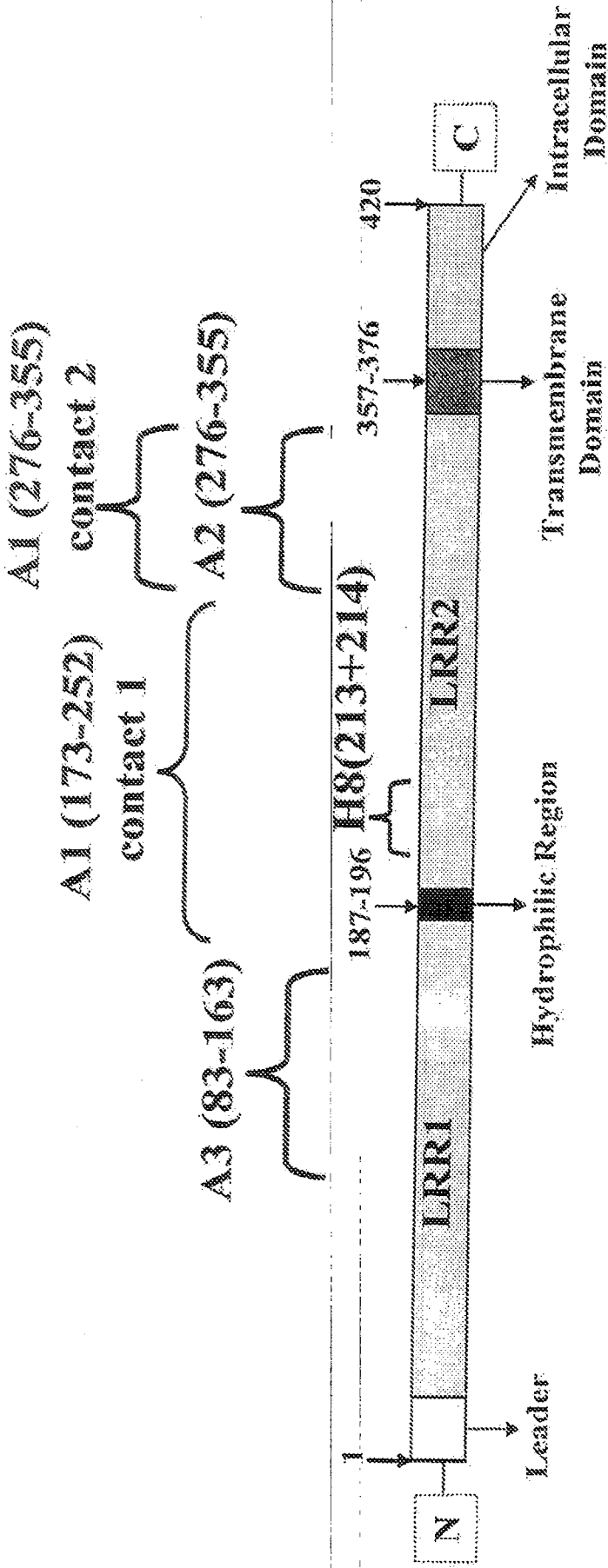


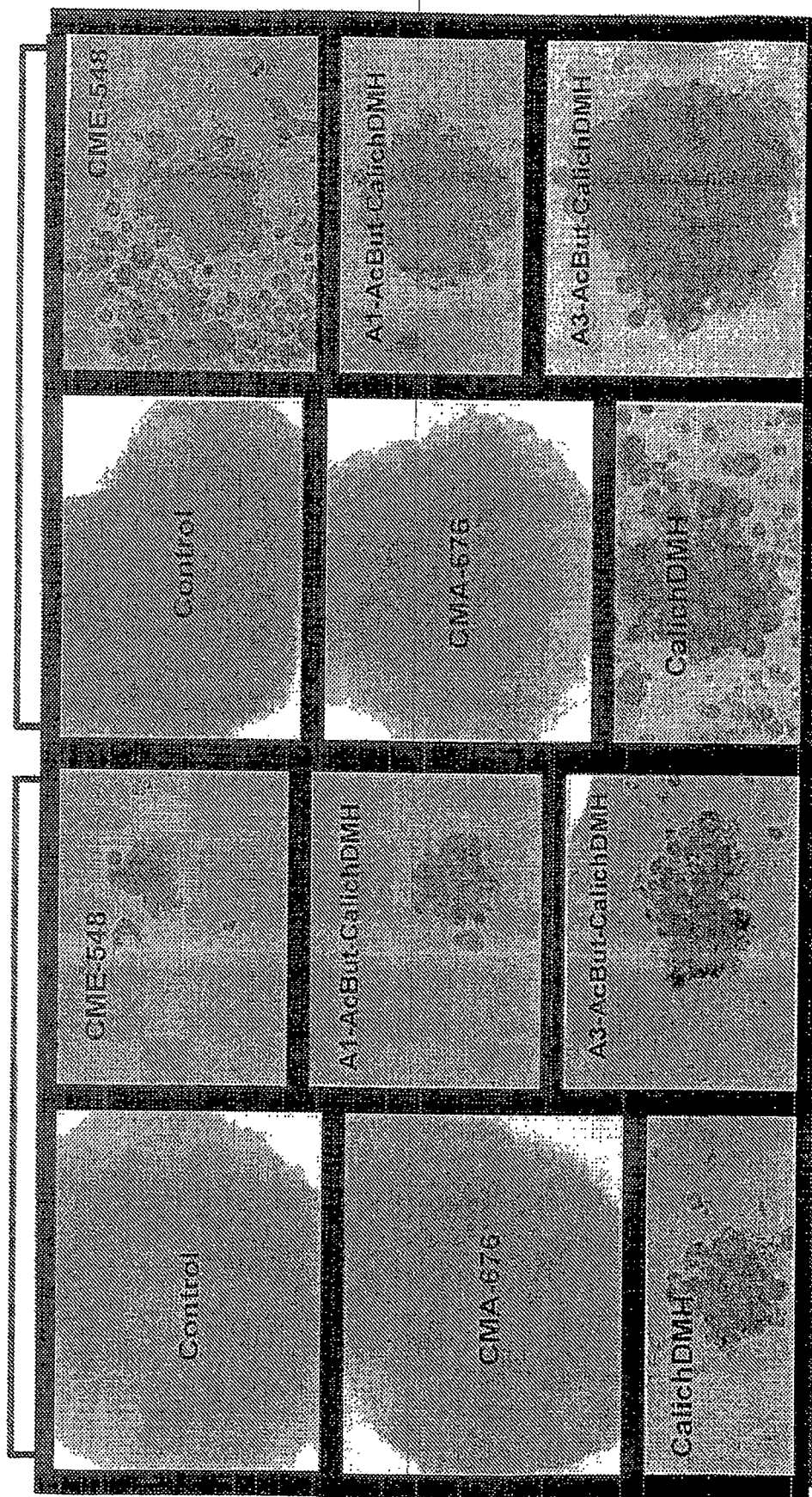
FIG. 7



12/29

FIG. 8

MDAMB435/5T4 MDAMB435/neo



13/29

FIG. 9A

Humanized A1 VH-version 1.0 DNA

CAGGTGCAGCTGGTGCATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG
 GTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACCTTCACAACTTTGGAATGAACTGGGTGCGA
 CAGGCCCTGGACAAGGGCTTAAGTGGATGGGATGGATAAACACCAACACTGGAGAG
 CCAAGATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTC
 AGCACTGCCATATCTGCAGATCTCCAGCCTGAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTAC
 TGTGCCAGAGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTT
 GTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:48)

Humanized A1 VH-version 1.0 Protein

QVQLVQSGSEELKKPGASVKVSKASGYTFITNFGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTNTGE
 PRYAEEFKGRFVPSLDTSVSTAYLQISSLKAE⁴⁸DTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGTL
 VTVSS (SEQ ID NO:49)

Humanized A1 VH-version 1.1 DNA

CAGGTGCAGCTGGTGCATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG
 GTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACCTTCACAACTTTGGAATGAACTGGGTGCGA
 CAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAAGTGGATGGGATGGATAAACACCAACACTGGAGAG
 CCAAGATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTC
 AGCACTGCCATATCTGCAGATCTCCAGCCTGAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTAC
 TGTGCCAGAGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTT
 GTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:50)

Humanized A1 VH-version 1.1 Protein

QVQLVQSGSEELKKPGASVKVSKASGYTFITNFGMNWVRQAPGQGLEWWMGWINTNTGE
 PRYAEEFKGRFVPSLDTSVSTAYLQICSLKAE⁵⁰DTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGTL
 VTVSS (SEQ ID NO:51)

Humanized A1 VH-version 1.2 (CDR grafted into the DP-21 germline, VH7 sub-group)

QVQLVQSGSEELKKPGASVKVSKASGYTFITNFGMNWVRQAPGQGLEWWMGWINTNTGE
 PRYAEEFKGRFVPSLDTSVSTAYLQICSLKAE⁵²DTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGTL
 VTVSS (SEQ ID NO:52)

Any of the following amino acids could be substituted at these designated positions
 K46, C67, S82a and N82a.

14/29

FIG. 9B

Humanized A1 VH-version 2.0 DNA

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
 CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATATACCTTCACAACTTTGGAATGAACTGGGTCCGC
 CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGCTGGCTGGATAAACACCAACACCGGTGAG
 CCAAGATATGCTGAAGAGTTCAAGGACGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
 AACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCTGTGTATTAC
 TGTGCCAGAGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTT
 GTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 53)

Humanized A1 VH-version 2.0 Protein (CDR grafted into the DP-54 germline, VH3 sub-group)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFITNFGMNWVRQAPGKGLEWVAVINTNTGE
 PRYAREEFKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGT
 LTVVSS (SEQ ID NO: 54)

Any of the following amino acids could be substituted at these designated positions
 K46, M48, G49, C67, L71, T73, T74, A75, S76 and A78.

Humanized A1 VH-version 2.1 DNA

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
 CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATATACCTTCACAACTTTGGAATGAACTGGGTCCGC
 CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGAAGTGGATGGCTGGATAAACACCAACACCGGTGAG
 CCAAGATATGCTGAAGAGTTCAAGGACGATTACCATCTCCCTGGACAACGCCAAG
 TCCTCAGCCTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCTGTGTATTAC
 TGTGCCAGAGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTT
 GTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 55)

Humanized A1 VH-version 2.1 Protein

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFITNFGMNWVRQAPGKGLKWMGWINTNTGE
 PRYAREEFKGRFTISLDNAKSSAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGT
 LTVVSS (SEQ ID NO: 56)

15/29

FIG. 9C

Humanized A1 VL-version 1.0 DNA

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCC
ACCATCAACTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCTGACCGCTTCTCCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 57)

Humanized A1 VL-version 1.0 Protein (CDR grafted into the DPK24 germline,
VKIV sub-group)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDAVWYQQKPGQPPLLIYFATNRYTG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQDDYSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO: 58)

Any of the following amino acids could be substituted at these designated positions
S43, N49, N60, T63, Y67, F73, L85 and F87.

Humanized A1 VL-version 1.1 DNA

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCC
ACCATCAACTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCTGACCGCTTCTCCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 59)

Humanized A1 VL-version 1.1 Protein

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDAVWYQQKPGQPPLLIYFATNRYTG
VPDRFSGSGYGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQDDYSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ
ID NO: 60)

Humanized A1 VL-version 2.0 DNA

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG
AAACCAGGCAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATTTTGGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGGCAACTTACTACTGTTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 61)

16/29

FIG. 9D

Humanized A1 VL-version 2.0 Protein (CDR grafted into the DPK9 germline, VKI sub-group)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAVWYQQKPKAPKLLIYFATNRYTG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGGGTKVEIK (SEQ
ID NO: 62)

Any of the following amino acids could be substituted at these designated positions
V3, Q42, S43, N49, N60, Y67, F73, L85 and F87.

Humanized A1 VL-version 2.1 DNA

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTCTGCATCTGTCCGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGATCAGCAG
AAACCAGGCAAATCCCCTAAGCTCCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 63)

Humanized A1 VL-version 2.1 Protein

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAVWYQQKPKSPKLLIYFATNRYTG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGGGTKVEIK (SEQ
ID NO: 64)

Humanized A1 VL-version 2.2 DNA

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTCTGCATCTGTCCGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGATCAGCAG
AAACCAGGCAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCAATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 65)

Humanized A1 VL-version 2.2 Protein

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAVWYQQKPKAPKLLINFATNRYTG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGGGTKVEIK (SEQ
ID NO: 66)

17/29

FIG. 9E

Humanized A1 VL-version 2.3 DNA

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG
AAACCAGGCCAAAGCCCCCTAAGCTCTCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCAAAACCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACCTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:67)

Humanized A1 VL-version 2.3 Protein

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSNDAVWYQQKPKAPKLLIYFATNRYTG
VPSRFGSGSGGTDFLTITISLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGGQGTKVEIK (SEQ
ID NO:68)

Humanized A1 VL-version 2.4 DNA

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG
AAACCAGGCCAAAGCCCCCTAAGCTCTCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATACGGCACAGATTTCACCTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:69)

Humanized A1 VL-version 2.4 Protein

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSNDAVWYQQKPKAPKLLIYFATNRYTG
VPSRFGSGSGYGTDFLTITISLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGGQGTKVEIK (SEQ
ID NO:70)

Humanized A1 VL-version 2.5 DNA

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG
AAACCAGGCCAAAGCCCCCTAAGCTCTCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACCTTTCACCATCAGC
AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:71)

Humanized A1 VL-version 2.5 Protein

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQSVSNDAVWYQQKPKAPKLLIYFATNRYTG
VPSRFGSGSGGTDFLTITISLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGGQGTKVEIK (SEQ
ID NO:72)

18/29

FIG. 9F

Humanized A1 VL-version 3.0 DNA

GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCCCTGTCTCCAGGCGAAAGAGCC
 ACCCTCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAGCAG
 AAACCTGGGCAGGCTCCAGGCTGCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGC
 ATCCCAGCCCGCTTCTCCGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
 AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTCAGTTTATTACTGTCTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
 TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 73)

Humanized A1 VL-version 3.0 Protein (CDR grafted into the DPK23 germline, VKIII sub-group)

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASQSVSNDAVANYQOKPGQAPRLLIYFATNRYTG
 IPARFSGSGSDFTLTITSSLPEDFAVYYCQDYSSFWTFGQGTKVEIK (SEQ
 ID NO: 74)

Any of the following amino acids could be substituted at these designated positions
 F10, S43, N49, V58, N60, Y67, F73, L85 and F87.

Humanized A1 VL-version 3.1 DNA

GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCCCTGTCTCCAGGCGAAAGAGCC
 ACCCTCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAGCAG
 AAACCTGGGCAGGCTCCAGGCTGCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGC
 ATCCCAGCCCGCTTCTCCGGCAGCGGCTACGGCACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
 AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTCAGTTTATTACTGTCTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
 TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 75)

Humanized A1 VL-version 3.1 Protein

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASQSVSNDAVANYQOKPGQAPRLLIYFATNRYTG
 IPARFSGSGYGTDFLTITSSLPEDFAVYYCQDYSSFWTFGQGTKVEIK (SEQ
 ID NO: 76)

19/29

FIG. 9G

huA2 VH Version 1.0 (CDR grafted into the DP-75 germline, VH1 subgroup)

QVQLVQSGCAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYVISWVRQAPGGGLEWMGEIYPGSNS
IYYNEKFKGRVTMTDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGGNYGFDYWGQGLVT
 VSS (SEQ ID NO: 77)

Any of the following amino acids could be substituted at these designated positions
 K38, R40, T41, I48, I69, T75, Q81, S82b, E85 and M94.

huA2 VH Version 2.0 (CDR grafted into the DP-54 germline, VH3 subgroup)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYVISWVRQAPGKGLEWVAETYPGSNS
IYYNEKFKGEFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYGFDYWGQGLVT
 VSS (SEQ ID NO: 78)

Any of the following amino acids could be substituted at these designated positions
 K38, R40, T41, I48, G49, A67, A71, K73, S74, S76, A78 and M94.

huA2 VL Version 1.0 (CDR grafted into the DPK20 germline, VKIII subgroup)

ETVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVNSNYLHWYQQKPKGLAPRLLIYSTSNLAS
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRSPLTFGGGTKVEIK (SEQ
 ID NO: 79)

Any of the following amino acids could be substituted at these designated positions
 S43, W47, A60, S70, S77, M78, and A80.

huA2 VL Version 2.0 (CDR grafted into the DPK9 germline, VKI subgroup)

DIQMTQSPFSSLSASVGDRTITCTASSSVNSNYLHWYQQKPKAPKLLIYSTSNLAS
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYHRSPLTFGGGTKVEIK (SEQ
 ID NO: 80)

Any of the following amino acids could be substituted at these designated positions
 V3, L4, S43, W47, S70, and M78.

20/29

FIG. 9H

huA3 VH Version 1.0 (CDR grafted into the DP-29 germline, VH3 subgroup)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIIRSKSNN
YATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARQWDYDVRAMNYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 81)

Any of the following amino acids could be substituted at these designated positions
 A49, Q75, S76, M89, C91 and V93.

huA3 VH Version 2.0 (CDR grafted into the DP-54 germline, VH3 subgroup)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNN
YATYYADSVKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQWDYDVRAMNYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 82)

Any of the following amino acids could be substituted at these designated positions
 D73, Q75, S76, M89, C91 and V93.

huA3 VL Version 1.0 (CDR grafted into the DPK24 germline, VKIV sub-group)

DIQMTQSPFDSLAVSLGERATINCKASQDNDTAVAWYQQKPGQPPLLIYWASTRLTG
VPERFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ
 ID NO: 83)

Any of the following amino acids could be substituted at these designated positions
 S43, D85 and F87.

huA3 VL Version 2.0 (CDR grafted into the DPK9 germline, VKI subgroup)

DIQMTQSPFSLASVGRVTITCKASQDNDTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRLTG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ
 ID NO: 84)

Any of the following amino acids could be substituted at these designated positions
 3V, Q42, S43, D60, D85 and F87.

FIG. 10A

	FR1	CDR1	FR2	SEQ ID NO.
VH1 consensus	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT		WVRQAPGQGLEWMG	25-27
VH1 locus				
1-3 1-02	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	G--YYMH	WVRQAPGQGLEWMG	14
1-3 1-03	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	S--YAMH	WVRQAPGQGLEWMG	15
1-3 1-08	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	S--YDIN	WVRQATGQGLEWMG	16
1-2 1-18	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	S--YGIS	WVRQAPGQGLEWMG	17
1-U 1-24	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYILT	E--LSMH	WVRQAPGKGLEWMG	18
1-3 1-45	QMQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT	Y--RYLH	WVRQAPGQALEWMG	19
1-3 1-46	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	S--YYMH	WVRQAPGQGLEWMG	20
1-3 1-58	QMQLVQSGPEVKKPGTSVKVSCKASGFTFT	S--SAVQ	WVRQARGQRLWIG	21
1-2 1-69	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS	S--YALS	WVRQAPGQGLEWMG	22
1-2 1-e	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS	S--YALS	WVRQAPGQGLEWMG	23
1-2 1-f	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYIFT	D--YYMH	WVQQAPEGKLEWMG	24

21/29

FIG. 10A-1

CDR2		FR3	SEQ ID NO.	
VH1 consensus		RVTITRDTSTAYMELSSLRSED ² AVYYCAR	25-27	
VH1 locus				
1-3	1-02	WINP--NSGGTNYAQKFQ		
1-3	1-03	WINA--GNGNTKYSQKFQ	14	22
1-3	1-08	WMNP--NSGNTGYAQKFQ	15	29
1-2	1-18	WISA--YNGNTNYAQKLQ	16	
1-0	1-24	GFDP--EDGE ² TIYAKKFQ	17	
1-3	1-45	WITP--FNGNTNYAQKFQ	18	
1-3	1-46	IINP--SGGSTSYAQKFQ	19	
1-3	1-58	WIVV--GSGNTNYAQKFQ	20	
1-2	1-69	GIIP--IFGTANYAQKFQ	21	
1-2	1-e	GIIP--IFGTANYAQKFQ	22	
1-2	1-f	LVDP--EDGE ² TIYAEKFQ	23	
		RVTITADTSTDTAYMELSSLRSED ² AVYYCAT	24	

23/29

FIG. 10B

Amino acid sequences of human germline genes of VH 7 subgroup

DP-21 (VH 7) GenBank Accession No. CAA43346 (SEQ ID NO:88)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTSYAMNWVRQAPGQGLEWMG
WIN
TNTGNFTIYAQGFTGRFVPSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDSEGYSS
DFWSGYFYYYMDVWGKGITVTVSS

Amino acid sequences of human germline genes of VH 3 subgroup

DP-54 (VH 3-07) GenBank Accession No. AB019440 (SEQ ID NO:89)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANI
KQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

DP-47 (VH3-23) GenBank Accession No. AB019439 (SEQ ID NO:90)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

DP-49 (VH 3-30) GenBank Accession No. AB019439 (SEQ ID NO:91)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
SYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

DP-53 (VH3-74) GenBank Accession No. AB019437 (SEQ ID NO:92)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRI
NSDGSSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

DP-48 (VH3-13) GenBank Accession No. AB019440 (SEQ ID NO:93)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQATGKGLEWVSAI
GTAGDTYYPGSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAR

24/29

FIG. 11

SEQ ID NO.		CDR1									
29	L16_germline	...	EIVMTQS	PATLSVSPGE	RATLSQ	RASQ	SVSS	NLAWY	QOKPGQAPRL		
30	L2_germline	...	EIVMTQS	PATLSVSPGE	RATLSQ	RASQ	SVSS	NLAWY	QOKPGQAPRL		
31	A27_germl_VL	...	EIVLTQS	PQTLSLSPGE	RATLSQ	RASQ	SVSS	YLAWY	QOKPGQAPRL		
32	L6_germl_VL	...	EIVLTQS	PATLSLSPGE	RATLSQ	RASQ	SVSS	YLAWY	QOKPGQAPRL		
33	L10_germl_VL	...	EIVMTQS	PPTLSLSPGE	RVTLSQ	RASQ	SVSS	YLAWY	QOKPGQAPRL		
34	L25_germl_VL		EIVMTQS	PATLSLSPGE	RATLSQ	RASQ	SVSS	YLAWY	QOKPGQAPRL		
		CDR2									
29	L16_germline	LIVGASTRAT									
30	L2_germline	LIVGASTRAT									
31	A27_germl_VL	LIVGASSRAT									
32	L6_germl_VL	LIVDASNRAT									
33	L10_germl_VL	LIVGASTRAT									
34	L25_germl_VL	LIVGASTRAT									
		CDR3									
		GIPARFSGSG	SGTEFTLTIS	SQSEDFAVY	YQQYNNWPP	TV					
		GIPARFSGSG	SGTEFTLTIS	SQSEDFAVY	YQQYNNWP	.					
		GIPDRFSGSG	SGTDFTLTIS	RLEPEDFAVY	YQQYGGSSP	.					
		GIPARFSGSG	SGTDFTLTIS	SLEPEDFAVY	YQQRSNWP	.					
		SIPARFSGSG	SGTDFTLTIS	SQPEDFAVY	YQQQDHNLP	.					
		GIPARFSGSG	SGTDFTLTIS	SQPEDFAVY	YQQQDYNLP	.					

FIG. 12

SEQ ID NO.		FR1	CDR1	FR2
35	012	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISS-----YLN	WYQQKPGKAPKLLIY
36	02	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISS-----YLN	WYQQKPGKAPKLLIY
37	018	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	QASQDI SN-----YLN	WYQQKPGKAPKLLIY
38	08	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	QASQDI SN-----YLN	WYQQKEGKAPKLLIY
39	A20	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGISN-----YLA	WYQQKPGKVPKLLIY
40	L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGISN-----YLA	WFQQKPGKAPKSLIY
41	L15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQGISS-----WLA	WYQQKPEKAPKSLIY
42	L8	DIQMTQSPSELSASVGDRVTITC	RASQGISS-----YLA	WYQQKPGKAPKLLIY
43	L12	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC	RASQSISS-----WLA	WYQQKPGKAPKLLIY
44	L11	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQSISS-----WLA	WYQQKPGKAPKLLIY

FIG. 12-1

SEQ ID NO.		CDR2	FR3	CDR3
35	012	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	QQSYSTP
36	02	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	QQSYSTP
37	018	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	QQYDNLP
38	08	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	QQYDNLP
39	A20	AASTLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	QKYNAP
40	L1	AASSLOS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	QQYNSYP
41	L15	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	QQYNSYP
42	L8	AASTLQS	GVPSRFSGSGSGTEFTLTIS	QQLNSYP
43	L12	DASSLES	GVPSRFSGSGSGTEFTLTIS	QQYNSYS
44	L11	DASSLES	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	QQYNSYS

27/29

FIG. 13

Amino acid sequences of human germline genes of Vk I subgroup

DPK9 (O12, Vk I) GenBank Accession No. X59315 (SEQ ID NO:94)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

O2 (O2, Vk I) GenBank Accession No. X59312 (SEQ ID NO:95)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

DPK 1 (Vk I, J18) GenBank Accession No. M64856 (SEQ ID NO:96)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN
LETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDIATYYCQQYDNLP

DPK 7 (Vk I, L15) GenBank Accession No. K01323 (SEQ ID NO:97)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASS
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYP

Amino acid sequences of human germline genes of Vk IV subgroup

DPK24 (B3, VkiV) GenBank Accession No. Z00023 (SEQ ID NO:98)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKL
LIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDEVAVYYCQQYYSTP

Amino acid sequences of human germline genes of Vk III subgroup

DPK 23 (Vk-III, L25) GenBank Accession No. X72820 (SEQ ID NO:99)

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLSWYQQKPGQAPRLLIYGAST
RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQDYNLP

FIG. 14

Human IgG4_mutated (hinge mutation S241P) (SEQ ID NO:45)

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEF
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQV
YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Human IgG1 (SEQ ID NO:46)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPRE
PQVYTLPPSRHEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Human Kappa (SEQ ID NO:47)

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQRESVTE
QDSKDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 15

Black-tailed Marmoset 5T4

MPGGCSRGPAAAGNGRLRLARLALVLLGWVSSSSPTSSASSSSSSAPFLASAVSAQPL
LPGQCPALCECSEAARTVKCVNRNLTEVPTDLPPYVRNLFLTGNQLAVLPAGAFARV
PPLAELAALNLGSRLEDVQAGAFEHLPSLRQLDLSHNPLAVLSPFAFSGSNASVSA
PSPLVELILNHIVPPEDERNNRSFEGMVVAALRAGGALHGLHRLELASNHFLYLPRD
VLAQLPSLRHLDLSNNSLVSLTYVSFRNLTHLESLEHLEDNALKVLHNGTLAELOGLP
HVRVFLDNNPWVCDCHMADMVAWLKETEVVQGYQLTCAFFEKMNRVLELNSADL
DCDPIPPPSLQTSYVFLGIVLALIG (SEQ ID NO:85)

Cynomologous monkey 5T4

MPGGCSRGPAAAGDGRRLRLARLALVLLGWVSSSSPTSSASSFSSSAPFLASAASAQPP
LPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLTEVPTDLPLYVRNLFLTGNQLAVLPAGAFARR
PPLAELAALNLGSRLEDEVRAAGAFEHLPSLRQLDLSHNPLAYLSPFAFSGSNASISA
PSPLVELILNHIVPPDDKRONRSFEGMVAAALVAGRALOGLHLELASNHFLYLPRD
VLAQLPSLRYLDELNSNLSLVSLTYVSFRNLTHLESLEHLEDNALKVLHNGTLAELOGLP
HVRVFLDNNPWVCDCHMADMVTWLKQTEVVQGDRLTCAFFEKMNRVLELNSADL
DCDPIPPPSLQTSYVFLGIVLALIGAIFLLVLYLNKGIKKWMHNIRDACRDHMEGY
HYRYEINADPRLTNLSNSDV (SEQ ID NO:86)

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

MEIGS, Julie, Broadus
Pillsbury Winthrop Shaw Pittman LLP
P.O. Box 10500
McLean, VA 22102
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 01 June 2007 (01.06.2007)	
Applicant's or agent's file reference 40000-359813	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2007/063685	International filing date (day/month/year) 09 March 2007 (09.03.2007)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 10 March 2006 (10.03.2006)
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 March 2006 (10.03.2006)	60781346	US	25 May 2007 (25.05.2007)
23 February 2007 (23.02.2007)	60891248	US	25 May 2007 (25.05.2007)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Beate Giffo-Schmitt
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Facsimile No. +41 22 338 82 70 Telephone No. +41 22 338 74 03

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

PCT

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(Artículo 18 y Reglas 43 y 44 del PCT)

Referencia al expediente del solicitante o del mandatario 40000-359813	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
No. de solicitud internacional PCT/US2007/063685	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 09/03/2007
(Fecha de Prioridad) (La más cercana) (día/mes/año) 10/03/2006	
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 7 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 las bases de:

☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual ha sido presentada.

☐ una traducción de la solicitud internacional _____, que está en el idioma de la traducción proporcionada para los propósitos de la búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1 (b)).

b. ☒ Con respecto a cualquier **secuencia de aminoácidos y/o nucleótidos** descrita en la solicitud internacional, Ver Cuadro No. I

2. ☒ **Ciertas reivindicaciones no se pueden ser el objeto de una búsqueda** (ver el Cuadro II).

3. ☐ **Se carece de unidad de la invención** (ver Cuadro III).

4. Con respecto al **título**,

☒ el texto se aprueba tal como lo presentó el solicitante,

☐ esta Autoridad 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, proporcionar 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. _____

☐ 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 ha sido publicada con el resumen

REPORTE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional
No.

PCT/US2007/063685

Cuadro No. I Secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos (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 necesariamente a la invención reivindicada, la búsqueda internacional se llevó a cabo en la bases de:

a. tipo de material

- ☒ un listado de secuencias
☐ tabla(s) relacionada(s) al listado de secuencias

b. formato del material

- ☒ en la forma escrita
☒ en la forma leíble por computadora

c. tiempo de presentación/acabado

- ☒ contenida en la solicitud internacional como se presentó
☒ presentada conjuntamente con la solicitud internacional en la forma leíble por computadora
☐ presentada de manera subsecuente a esta Autoridad para los propósitos de búsqueda.

2. ☐ Además, en el caso de más de una versión o copia de un listado de secuencia Y/o tabla que se refiere a la misma se ha presentado o terminado, las declaraciones requeridas que la información en la copia subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud como se presentó o que no va más allá de la solicitud como se presentó, como es apropiado, se presentaron.

3. Comentarios adicionales:

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. de Solicitud Internacional
PCT/US2007/063685

A. CLASIFICACION DEL ASUNTO RELACIONADO INV. C07K 16/30 A61K 39/395 C07K 14/47 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) 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, WPI Data, BIOSIS, Búsqueda de Secuencia		
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	WO 03/038098 A (OXFORD BIOMEDICA LTD [GB]; CARROLL MILES [GB]; LAMIKANRA ABIGAIL [GB];) 08 de Mayo de 2003 (2003-05-08) página 2, renglón 11 – página 9, renglón 4 reivindicaciones; ejemplos	1-47
X	FORSBERG G ET AL: "THERAPY OF HUMAN NON-SMALL –CELL LUNG CARCINOMA USING ANTIBODY TARGETING OF A MODIFIED SUPERANTIGEN" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 85, no. 1, 6 de Julio de 2001 (2001-07-06), páginas 129-136, XP001145660 ISSN: 0007-0920 el documento completo	1-47
☒ Documentos adicionales se listan en la continuación del cuadro C.		☒ 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 citación 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 actividad inventiva cuando el documento se toma solo "Y" documento de pertinencia particular; la invención reivindicada no se puede considerar que comprende un actividad inventiva 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 26 de Septiembre de 2007		Fecha de envío del reporte de búsqueda internacional 04/10/2007
Nombre y dirección de envío de la ISA/ Oficina Europea de Patentes, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Funcionario autorizado Rankin, Robert

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. Solicitud Internacional
PCT/US2007/063685

DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERAN PERTINENTES (continuación)		
Categoría*	Citación del documento, con indicación, donde es apropiado, de los pasajes pertinentes	Pertinente para la Reivindicación No.
X	SHAW A D M ET AL: "Isolation of a high affinity scFv from a monoclonal antibody recognising the oncofoetal antigen 5T4" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA – GENERAL SUBJECTS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHER, NL, vol. 1524, no. 2-3, 15 de Diciembre de 2000 (2000-12-15), páginas 238-246, XP004275928 ISSN: 0304-4165 el documento completo	1-47
X	SHAW A D M ET AL: "Glycosylation and epitope mapping of the 5T4 glycoprotein oncofoetal antigen" BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, vol. 363, no. 1, 01 de Abril de 2002 (2002-04-01), página 137-145, XP002444306 ISSN: 0264-6021 el documento completo	1-47
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, Noviembre de 2002 (2002-11), páginas 884-896, XP009007160 ISSN: 0929-1903 el documento completo	1-47
A	MYERS K A ET AL: "ISOLATION OF A CDNA ENCODING 5T4 ONCOFETAL TROPHOBLAST GLYCOPROTEIN" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM,, US, vol. 269, no. 12, 25 de Marzo de 1994 (1994-03-25), páginas 9319-9324, XP002064468 ISSN: 0021-9258 resumen	1-47
A	WOODS ANDREW M ET AL: "Characterization of the murine 5T4 oncofoetal antigen: A target for immunotherapy in cancer" BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, vol. 366, no. 1, 15 de Agosto de 2002 (2002-08-15), páginas 353-365, XP002341798 ISSN: 0264-6021 resumen	1-47

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

No. Solicitud Internacional
PCT/US2007/063685

DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERAN PERTINENTES (continuación)		
Categoría*	Citación del documento, con indicación, donde es apropiado, de los páajes pertinentes	Pertinente para la Reivindicación No.
P, X	WO 2006/042158 A (WYETH CORP [US]; SINACORE MARTIN S [US]; LEONARD MARK [US]; LAKEN HALE) 20 de Abril de 2006 (2006-04-20) página 1, renglón 35 – página 2, renglón 17 página 8, renglón 9 – renglón 17 página 18, renglón 16 – página 29, renglón 25 página 25, renglón 26 – página 26, renglón 16 reivindicaciones; ejemplo 3	1-47
P, X	WO 2006/031653 A (WYETH CORP [US]; BOGHAERT ERWIN R [US]; DAMLE NITIN K [US]; GILL DAVIN) 23 de Marzo de 2006 (2006-03-23) página 1, renglón 7 – renglón 11 página 4, renglón 10 – renglón 26 reivindicaciones; ejemplos	1-47

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Número de Solicitud Internacional
PCT/US 2007/063685

Cuadro No. II Observaciones donde ciertas reivindicaciones no fueron localizables (Continuación del punto 2 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. ☒ Reivindicaciones Nos.:
Debido a que se relacionan con el tema que no requiere que sea buscado por esta Autoridad, específicamente:
Aunque las reivindicaciones 36-39 se refieren a un método de tratamiento del cuerpo humano, la búsqueda se ha llevado a cabo y se ha basado en los efectos alegados del compuesto
- 2. ☐ Reivindicaciones Nos.:
Debido a que se refieren a partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos previstos a un grado tal que no se puede llevar una búsqueda internacional significativa, específicamente:
- 3. ☐ Reivindicaciones Nos.:
Debido que son reivindicaciones dependientes y no asignan con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Cuadro No. III. Observaciones donde se carece de la unidad de la invención (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, específicamente las reivindicaciones Nos.:
- 4. ☐ Ninguna de las tasas 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.

55

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
 Información sobre los miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.:
PCT/US2007/063685

Documento de la patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembros de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 03038098 A	08-05-2003	EP 1440152 A2 US 2005175618 A1	28-07-2004 11-08-2005
WO 2006042158 A	20-04-2006	AU 2005294131 A1 AU 2005294373 A1 CA 2582157 A1 CA 2582194 A1 EP 1797182 A2 EP 1828251 A2 KR 20070073885 A WO 2006041934 A2	20-04-2006 20-04-2006 20-04-2006 20-04-2006 20-06-2007 05-09-2007 10-07-2007 20-04-2006
WO 2006031653 A	23-03-2006	AR 050642 A1 AU 2005285152 A1 CA 2578131 A1 EP 1786469 A2 KR 20070050956 A US 2006088522 A1	08-11-2006 23-03-2006 23-03-2006 23-05-2007 16-05-2007 27-04-2006

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

De la AUTORIDAD DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para:

ver forma PCT/ISA/220

PCT

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD ENCARGADA
DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
(Regla 43bis.1 de PCT)

Fecha de envío: (día/mes/año)

ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)

Referencia al expediente del Solicitante o Mandatario
ver forma PCT/ISA/220

PARA ACCIÓN ADICIONAL
Ver Párrafo 2 más adelante

Número de Solicitud Internacional:
PCT/US2007/063685

Fecha de Presentación Internacional: (día/mes/año)
09.03.2007

Fecha de prioridad (día/mes/año)
10.03.2006

Clasificación Internacional de Patente (IPC) o tanto la clasificación internacional como la IPC
INV. C07K 16/30 A61K 39/395 C07K 14/47

Solicitante:

WYETH

1. Este reporte contiene las indicaciones que están relacionadas con los siguientes puntos:

- ☒ Cuadro No. I Base del reporte
- ☒ Cuadro No. II Prioridad
- ☒ Cuadro No. III Ningún establecimiento del reporte con respecto a la novedad, actividad inventiva, o aplicabilidad industrial
- ☐ Cuadro No. IV Carencia de unidad de la invención
- ☒ Cuadro No. V Declaración razonada de acuerdo con la Regla 66.2 con respecto a la novedad, actividad inventiva o aplicabilidad industrial; las citas y explicaciones que soportan tal declaración
- ☒ Cuadro No. VI Ciertos documentos citados
- ☐ Cuadro No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional
- ☒ Cuadro No. VII Ciertas observaciones en la solicitud internacional.

2. ACCIÓN ADICIONAL

Si se hace una solicitud para un examen preliminar internacional, esta opinión se considerará que es una opinión escrita de la Autoridad del Examen Preliminar Internacional ("IPEA") sin embargo, esto no aplica donde el solicitante elige una autoridad diferente de esta para ser la IPEA y la IPEA elegida ha notificado a la Oficina Internacional de acuerdo con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad Encargada de la Búsqueda Internacional.

Si esta opinión se considera, como se proporciona anteriormente, que es una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar a la IPEA una contestación escrita conjuntamente, donde sea apropiado, con enmiendas, antes del vencimiento de los 3 meses desde la fecha de envío de la forma PCT/ISA/220 o antes del vencimiento de los 22 meses desde la fecha de prioridad, cualquiera que expire posteriormente.

Para opciones adicionales, ver la forma PCT/ISA/220.

3. Para detalles adicionales, ver notas a la Forma PCT/ISA/220.

Nombre y dirección de envío de la ISA:
Oficina Europea de Patentes
D-80298 Munich
Tel: +49 89 2399 - 0 Tx: 523656
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fecha de terminación de esta opinión

ver forma
PCT/ISA/210

Oficial Autorizado
Rankin, Robert

Teléfono No. +49 89 2399-2659

**OPINIÓN ESCRITA DE LA
AUTORIDAD ENCARGADA
DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

No. de Solicitud Internacional
PCT/US2007/063685

Cuadro No. I Bases de la opinión

1. Con respecto al idioma, este reporte se basa en

- ☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual se ha presentado
para ☐ una traducción de la solicitud internacional en, que es el idioma de una traducción otorgada
los propósitos de:

2. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos descrita en la solicitud internacional, y necesario a la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido en las bases de:

a. tipo de material:

- ☒ un listado de secuencias
☐ tabla(s) que se refieren al listado de secuencias

b. formato del material

- ☒ en formato escrito
☒ en forma leíble por computadora

c. tiempo de la presentación/otorgamiento

- ☒ contenido en la solicitud internacional como se presentó
☒ presentado junto con la solicitud internacional en la forma leíble por computadora
☐ otorgado de manera subsiguiente a esta Autoridad para los propósitos de búsqueda

3. ☐ Además, en el caso de que más de una versión o copia del listado de secuencias y/o tablas que se relacionan se han presentado u otorgado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a esto en la solicitud como se presentó o no van más allá de la solicitud como se presentó, como es apropiado, se otorgó.

4. Comentarios adicionales:

Cuadro No. II Prioridad

1. ☒ Los siguientes documentos no se han establecido
copia de la solicitud pedida cuya prioridad se ha reivindicado (Regla 43bis.1 y 66.7(a))
traducción de la solicitud pedida, cuya prioridad se ha reivindicado (Regla 43bis.1 y 66.7(b))
De manera consecuente, no es posible considerar la validez de la reivindicación anterior. Esta
opinión sin embargo se ha establecido en la suposición de que la fecha pertinente es la fecha de
prioridad reivindicada.

2. ☐ Esta opinión se ha establecido como si no se ha reivindicado la prioridad, debido al hecho que la
reivindicación de prioridad se ha encontrado inválida (Reglas 43bis.1 y 64.1). De esta manera, para
los propósitos de esta opinión, la fecha de presentación internacional indicada anteriormente, se
considera como que es la fecha pertinente.

3. Observaciones adicionales, si es necesario:

**OPINIÓN ESCRITA DE LA
AUTORIDAD ENCARGADA
DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

No. de Solicitud Internacional
PCT/US2007/063685

Cuadro No. III No establecimiento de la opinión con respecto a la novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial.

1. Las cuestiones de si la invención reivindicada parece que es nueva, que comprende un actividad inventiva (que sea obvio), o que es aplicable industrialmente no serán examinadas a respecto de:

- ☐ la solicitud internacional completa
☒ reivindicaciones Nos. 36-39 (por razones de aplicabilidad industrial)

debido:

☒ la solicitud internacional, o las reivindicaciones Nos. 36-39 (por razones de aplicabilidad industrial) se relacionan al siguiente tema que no requiere un examen preliminar internacional (especifica):

ver hoja separada

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (indicar los elementos particulares a continuación) o las reivindicaciones Nos. _____ no son claras de modo que no se puede formar una opinión significativa:

☐ las reivindicaciones, o las reivindicaciones Nos.: _____ se soportan inadecuadamente por la descripción de modo que no se puede formar una opinión significativa.

☐ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para las reivindicaciones Nos. 87 (en parte)

☐ una opinión significativa no se podría formar sin las tablas que se relacionan a el listado de secuencias; el solicitante no, sin el tiempo límite pre-escrito:

☐ se proporciona un listado de secuencia en papel que cumple con la norma prevista por el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y este listado no está disponible para la Autoridad del Examen Preliminar Internacional en la forma y manera aceptables.

☐ se proporciona un listado de secuencia en forma electrónica que cumple con la norma prevista por el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y este listado no está disponible para la Autoridad del Examen Preliminar Internacional en la forma y manera aceptables.

☐ pagar la tasa de retraso requerida, provista para la provisión del listado de secuencias en respuesta a la invitación de acuerdo con las Reglas 13ter.1(a) o (b) y 13er.2.

☐ una opinión significativa no se podría formar sin las tablas que se relacionan a los listados de secuencia, el solicitante no habría, dentro del tiempo límite vencido, proporcionado estas tablas en la forma electrónica cumpliendo con los requerimientos técnicos provistos por el Anexo C-bis de las Instrucciones administrativas, y estas tablas no serán disponibles para la Autoridad de Examen Preliminar Internacional en la forma y manera aceptables.

☐ las tablas se relacionan a los listados de secuencia de aminoácidos y/o nucleótidos, si en la forma electrónica sólo, no cumplen con los requerimientos técnicos provistos para el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

**OPINIÓN ESCRITA DE LA
AUTORIDAD ENCARGADA
DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

No. de Solicitud Internacional
PCT/US2007/063685

☐ Ver hoja separada para detalles adicionales
Cuadro No. V Declaración razonada de acuerdo con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, actividad inventiva, y aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que soportan esta declaración

1. DECLARACIÓN	
Novedad (N)	Si Reivindicaciones <u>1-47</u> No Reivindicaciones -
Actividad Inventivo (PI)	Si Reivindicaciones - No Reivindicaciones <u>1-47</u>
Aplicabilidad Industrial (AI)	Si Reivindicaciones <u>1-35, 40-47</u> No Reivindicaciones -

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

Cuadro No. VI Ciertos Documentos citados

1.. Ciertos documentos publicados (Regla 43bis. 1 y 70.10)

y/o

2. Documentos no escritos (Reglas 43bis. 1 y 70.9)

Ver forma 210

Cuadro No. VIII. Ciertas observaciones de la solicitud internacional

Se hacen las siguientes observaciones en la claridad de las reivindicaciones, descripción y dibujos o en la cuestión de si las reivindicaciones se soportan completamente por la descripción.

ver hoja separada

Con Referencia al Punto III

No establecimiento de la opinión con respecto a la novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial

Las reivindicaciones 36-39 se refieren a materia considerada por esta Autoridad como que se cubre por las provisiones de la Regla 67.1(iv) del PCT. En consecuencia, no se formulará opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(i) del PCT)

Con Referencia al Punto V

Declaración razonada con respecto a la novedad, actividad inventiva o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que soportan esta declaración

Para la valoración de las presentes reivindicaciones 36-39 en la cuestión de si son industrialmente aplicables, no existen criterios unificados en los Estados Contractantes del PCT. La patentabilidad también puede ser dependiente de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia de las reivindicaciones para el uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, el uso de este compuesto para la elaboración de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

Documentos Citados

Se hace referencia a los siguientes documentos:

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 de 2002 (2002-11), páginas 884-896, XP009007160 ISSN: 0929-1903

D2: WO 03/038098 A (OXFORD BIOMEDICA LTD [GB]; CARROLL MILES [GB]; LAMIKANRA ABIGAIL [GB];) 08 de Mayo de 2003 (2003-05-08)

D3: FORSBERG G ET AL: "THERAPY OF HUMAN NON-SMALL -CELL LUNG CARCINOMA USING ANTIBODY TARGETING OF A MODIFIED SUPERANTIGEN" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 85, no. 1, 6 de Julio de 2001 (2001-07-06), páginas 129-136, XP001145660 ISSN: 0007-0920

D4: SHAW A D M ET AL: "Isolation of a high affinity scFv from a monoclonal antibody recognising the oncofoetal antigen 5T4" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA - GENERAL SUBJECTS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHER, NL, vol. 1524, no. 2-3, 15 de Diciembre de 2000 (2000-12-15), páginas 238-246, XP004275928 ISSN: 0304-4165

D5: SHAW A D M ET AL: "Glycosylation and epitope mapping of the 5T4 glycoprotein oncofoetal antigen" BIOCHEMICAL JOURNAL, THE BIOCHEMICAL SOCIETY, LONDON, GB, vol. 363, no. 1, 01 de Abril de 2002 (2002-04-01), página 137-145, XP002444306 ISSN: 0264-6021

Artículo 33(2) del PCT

**OPINIÓN ESCRITA DE LA
AUTORIDAD ENCARGADA
DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

No. de Solicitud Internacional
PCT/US2007/063685

La material de las reivindicaciones 1-47 se considera novedosa (Artículo 33(2) del PCT

Artículo 33(3) del PCT

La material de las reivindicaciones 1-47 no se considera inventiva (Artículo 33(3) del PCT.

Para la reivindicación 2, la técnica anterior más cercana es D1 que describe un anticuerpo anti-5T4 quimérico que comprende un ScFv murino fusionado a un fragmento Fc IgG1 humana. Este anticuerpo facilita la lisis de ADCC de células que expresan 5T4 y el documento menciona además la capacidad del anticuerpo para que se enlace a un fármaco citotóxico tal como caliqueamicina a fin de tratar mejor los cánceres (ver el documento completo).

La diferencia entre la materia de la reivindicación 1 y D1 es que el anticuerpo de la reivindicación 1 tiene dominios de unión a antígeno derivados de los anticuerpos A1, A2 o A3.

No parece haber ningún efecto técnico que surja de esta diferencia.

El problema que se va a solucionar por lo tanto se considera como el de proporcionar un anticuerpo alternativo al antígeno 5T4.

La materia de la reivindicación 1 soluciona este problema pero no se considera inventiva debido a que la persona experta verá la sola provisión de un anticuerpo alternativo como que es obvia (Artículo 33(3) del PCT).

Las reivindicaciones 2-5, 11-14 representan materia trivial que se consideraría como opciones de rutina a la persona experta.

Como lo admite el solicitante, se conoce en la técnica el reemplazo de serina con prolina en la posición 241 del a región constante de cadena pesada de IgG4 a fin de mejorar la estabilidad del anticuerpo, como una consecuencia, la indicación 15 tampoco es inventiva.

Los anticuerpos que tienen secuencias especificadas en las reivindicaciones 6-10, 16-25, 46 y 47 no parecen tener ninguna actividad sorprendente o inesperada asociada con los mismos cuando se compara a la técnica anterior. Estos también se ven como sólo alternativas que no requerirán habilidad inventiva para reproducirse.

Igualmente, los conjugados de anticuerpo/fármaco de las reivindicaciones 26-35 y el método de tratamiento en las reivindicaciones 26-39, representa materia que el experto en la técnica vea como obvia en vista de la técnica anterior.

Los anticuerpos de las reivindicaciones 40-43 que se definen de acuerdo a su especificidad de epitopo y puesto que representan sólo maneras alternativas de definir los anticuerpos anteriormente, también no se pueden considerar inventivos, puesto que no hay efecto técnico sorprendente asociado con estos. El hecho que los anticuerpos puedan reaccionar de forma cruzada con 5T4 de mono no es ni sorprendente ni inventivo.

Las reivindicaciones 44 y 45 se refieren a proteínas de 5T4 del mono cinomologus y el mono titi de cola negra. La persona experta, que conoce que este antígeno existe dentro de muchas especies (ver por ejemplo página 81 de la descripción), no tendría dificultad en aislar el antígeno de dos especies adicionales y producir anticuerpos contra este. De esta manera, las reivindicaciones 44 y 45 no se consideran inventivas.

De esta manera, las reivindicaciones 1-47 no se consideran inventivas (Artículo 33(3) del PCT).

Los documentos D2 a D5 también se consideran que son altamente pertinentes a la actividad inventiva de la presente solicitud.

D2 describe anticuerpos contra 5T4 unido a una toxina para uso terapéutico.

D3 también describe anticuerpos contra 5T4 unido a una toxina para uso terapéutico.

D4 describe fragmentos scFv de alta afinidad específicos para 5T4.

D5 describe correlación de epitopos del antígeno 5T4.

Con referencia al Punto VI

Ciertos documentos citados

Ciertos documentos publicados

Solicitud No.	Fecha de publicación	Fecha de presentación	Fecha de Prioridad
Patente No.	(día/mes/año)	(día/mes/año)	(reivindicación válida)
			(día/mes/año)
WO2006031653	23.03.2006	09.09.2005	10.09.2004
WO2006042158	20.04.2006	05.10.2005	05.10.2004

**OPINIÓN ESCRITA DE LA
AUTORIDAD ENCARGADA
DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

No. de Solicitud Internacional
PCT/US2007/063685

Con Referencia al Punto VIII

Ciertas observaciones en la solicitud internacional

Los nombres "A1, A2 o A3" dados a los anticuerpos a todo lo largo de las reivindicaciones son arbitrarias y no se refieren a ningún anticuerpo depositado identificable por un número de acceso. Por lo tanto estas reivindicaciones no son claras (Artículo 6 del PCT).

ANTICUERPOS ANTI-5T4 Y USOS DE LOS MISMOS

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere en general a anticuerpos anti-5T4 y conjugados anticuerpo/fármaco (es decir, inmunoconjugados) para el diagnóstico y/o tratamiento de trastornos neoplásicos o malignos. La presente invención también se refiere a ácidos nucleicos y polipéptidos, aislados, de región variable, para preparar anticuerpos anti-5T4 y conjugados de anticuerpo/fármaco.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La disponibilidad de anticuerpos monoclonales de alta afinidad ha permitido el desarrollo de inmunoterapias dirigidas al objetivo. De acuerdo a este planteamiento, se acopla un agente terapéutico a un anticuerpo con especificidad de unión para una población celular objetivo definida. Los agentes terapéuticos que se han conjugado a anticuerpos monoclonales incluyen citotoxinas, modificadores de la respuesta biológica, enzimas (por ejemplo, ribonucleasas), proteínas y péptidos que inducen apoptosis, y radioisótopos. En general, los conjugados de anticuerpo/citotoxinas se refieren como inmunocitotoxinas. Los anticuerpos acoplados a fármacos de bajo peso molecular tal como metotrexato se llaman típicamente conjugados de quimioanticuerpo/fármaco. Los

conjugados descritos como inumnomoduladores contienen modificadores de la respuesta biológica tal como linfocinas, factores de crecimiento, y factor de veneno de cobra (CVF, por sus siglas en inglés) de activación de complemento. Los anticuerpos radiomarcados incluyen isótopos redioactivos que pueden ser usados para radioterapia así como formación de imágenes.

La distribución de fármacos mediada por anticuerpos a células tumorales aumenta la eficiencia de los fármacos al reducir al mínimo su captación en tejidos normales. Ver, por ejemplo, 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^{MR} (gemtuzumab ozogamicina) es una inmunoterapia dirigida comercialmente disponible que trabaja de acuerdo a este principio y que se aprobó para el tratamiento de leucemia mieloide aguda en pacientes de edad avanzada. Ver, Sievers et al. (1999) *Blood* 93: 3678-84. En este caso, la molécula de dirección a objetivo es un anticuerpo monoclonal anti-CD33 que se conjuga a caliqueamicina.

La inmunoterapia dirigida a objetivo en humanos se ha limitado, sin embargo, en parte debido a respuestas adversas a anticuerpos monoclonales no humanos. Los ensayos clínicos anteriores que usaron anticuerpos de roedor revelaron respuestas de anticuerpos anti-ratón (HAMA) y de anticuerpo

humano anti-rata (HARA), que da por resultado rápida depuración de los anticuerpos. Desde entonces se han desarrollado anticuerpos menos inmunogénicos, incluyendo anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos PRIMATIZED^{MR}, y anticuerpos humanos preparados usando bibliotecas de visualización en fagos o ratones transgénicos. Ver Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 81: 6851-5; Queen et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 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. La evasión de una respuesta de HAMA permite alta dosis y administración repetida de la dosis para lograr una respuesta terapéutica.

Los anticuerpos candidatos para dirección al objetivo por fármaco incluyen anticuerpos que reconocen antígenos oncofetales, es decir, antígenos presentes en células fetales y células neoplásticas, y que están en su mayor parte ausentes de las células de adultos normales. Ver, por ejemplo, Magdelenat (1992) *J. Immunol. Methods* 150: 133-43. El antígeno oncofetal 5T4 es una glicoproteína transmembrana altamente glicosilada de 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; Publicación Internacional PCT Número WO 89/07947; Patente de los Estados Unidos Número 5,869,053). 5T4 incluye un

dominio extracelular caracterizado por dos repeticiones de alto contenido de leucina (LRR) y una región hidrófoba interventora, que es un sitio accesible para terapia dirigida (Myers et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9319-24).

5 El 5T4 humano se expresa en numerosos tipos de cánceres, incluyendo carcinomas de la vejiga, mama, cerviz, endometrio, pulmón, esófago, ovario, páncreas, estómago y testículos, y está sustancialmente ausente de tejidos normales, excepto por sincitiotrofoblasto en placenta (ver,
10 por ejemplo, Southall et al. (1990) *Br. J. Cancer* 61: 89-95 (distribución inmunohistológica del antígeno 5T4 en tejidos normales y malignos); Mieke et al. (1997) *Clin. Cancer Res.* 3: 1923-1930 (molécula 1 de baja adhesión intercelular y alta expresión de 5T4 en células tumorales correlaciona con
15 supervivencia reducida libre de enfermedad en pacientes con carcinoma colorrectal); Starzynska et al. (1994) *Br. J. Cancer* 69: 899-902 (significación pronóstica de la expresión del antígeno oncofetal 5T4 en carcinoma colorrectal); Starzynska et al. (1992) *Br. J. Cancer* 66: 867-869 (expresión del
20 antígeno 5T4 en carcinoma colorrectal y gástrico); Jones et al. (1990) *Br. J. Cancer* 61: 96-100 (expresión del antígeno 5T4 en cáncer cervical); Connor y Stern (199) *Int. J. Cancer* 46: 1029-1034 (pérdida de expresión de MHC clase I en carcinomas cervicales); Ali et al. (2001) *Oral Oncology* 37:
25 57-64 (patrón de expresión del antígeno oncofetal 5T4 en

mucosa oral normal, displástica y maligna); Publicación Internacional PCT Número WO 89/07947; patente de los Estados Unidos Número 5,869,053). Por ejemplo, los tejidos reportados como que tienen expresión de 5T4 incluyen el hígado, piel, bazo, timo, sistema nervioso central (SNC), por sus siglas en inglés), glándulas suprarrenales, y ovario. Los tejidos reportados como que tienen expresión focal o baja de 5T4 incluyen el hígado, piel, bazo, nódulos linfáticos, amígdalas, tiroides, próstata y vesículas seminales. La expresión difusa débil-moderada de 5T4 se ha reportado en el riñón, pulmón, páncreas, faringe, y tracto gastrointestinal. El único tejido reportado que tiene alta expresión de 5T4 es el sincitiotrofoblasto; el 5T4 también estuvo ausente de suero normal o el suero de mujer embarazada (es decir, niveles < 10 ng/ml). La sobreexpresión de 5T4 en tumores se ha correlacionado con progreso de enfermedad, y se ha sugerido la valoración de la expresión de 5T4 como un planteamiento útil para identificar pacientes con prognosis a corto plazo (Mulder et al. (1997) *Clin. Cancer Res.* 3: 1923-30, Naganuma et al. (2002) *Anticancer Res.* 22: 1033-1038, Starzynska et al. (1994) *Br. J. Cancer* 69: 899-902, Starzynska et al. (1998) *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 10: 479-484, Wrigley et al. (1995) *Int. J. Gynecol. Cancer* 5: 269-274).

Se han descrito varios anticuerpos anti-5T4, que incluyen mAb5T4, también llamado el anticuerpo H8, que

reconoce un epítipo conformacional del antígeno 5T4 (Shaw et al. (2002) *Biochem. J.* 363: 137-45, Publicación Internacional Número WO 98/55607), un anticuerpo monoclonal de rata (Woods et al. (2002) *Biochem. J.* 366: 353-65), y un anticuerpo monoclonal de ratón llamado 5T4 (patente de los Estados Unidos número 5,869,053). También se han descrito anticuerpos anti-5T4 de cadena individual, así como proteínas de fusión que incluyen secuencias de anticuerpo anti-5T4 fusionadas a una molécula terapéutica. Por ejemplo, las secuencias del anticuerpo anti-5T4 fusionadas al dominio constante de IgG1 humana o al dominio extracelular de B7.1 murino inducen histólisis de líneas celulares tumorales que expresan 5T4 (Myers et al. (2002) *Cancer Gene Ther.* 9: 884-896, Shaw et al. (2000) *Biochim. Biophys. Acta.* 1524: 238-246; Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos número 2003/0018004). De manera similar, un anticuerpo anti-5T4 de cadena individual fusionado a un superligando puede estimular citólisis dependiente de células T de células de carcinoma pulmonar de células no pequeñas, *in vitro* (Forsberg et al. (2001) *Br. J. Cancer* 85: 129-136). El ensayo clínico de fase I que usa PNU-214936, un fragmento Fab murino del anticuerpo monoclonal 5T4 fusionado a una enterocitotoxina A (SEA) estafilococal de superantígeno mutado mostró toxicidad limitada y alguna respuesta anti-tumor (Cheng et al. (2004) *J. Clin. Oncol.* 22(4): 602-9). Como un planteamiento terapéutico

alternativo, también se sugieren vacunas de 5T4 recombinante para el tratamiento de cánceres (Mulryan et al. (2002) *Mol. Cancer Ther.* 1: 1129-37; Publicaciones de Solicitud de Patente del Reino Unido Número 2,370,571 y 2,378,704; Publicaciones de Solicitud de Patente EP Números EP 1,160,323 y 1,152,060).

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos anti-5T4, conjugados anti-5T4/fármaco, métodos para producir los anticuerpos descritos y conjugados de anticuerpo/fármaco, y métodos para su uso terapéutico y de diagnóstico.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos anti-5T4, conjugados de los mismos, y métodos para usar los mismos. También se proporcionan polipéptidos anti-5T4 aislados y ácidos nucleicos aislados que codifican para los mismos.

Los anticuerpos anti-5T4 de la invención incluyen anticuerpos que se unen de manera específica el antígeno 5T4 humano, en donde el anticuerpo (a) comprende un dominio de unión a antígeno de los anticuerpos A1, A2, o A3 murinos; (b) compite para la unión de 5T4 con los anticuerpos A1, A2, o A3 murinos; (c) se une a un epítipo de 5T4 unido por los anticuerpos A1, A2, o A3; o (d) comprende un fármaco de unión a 5T4 de un anticuerpo de (a)-(c). Los anticuerpos anti-5T4 de la invención pueden ser quiméricos, humanizados, de cadena

20

25

individual, un fragmento Fab, un fragmento F(ab)2, un
 fragmento Fv, tetramérico, tetravalente, multiespecífico,
 específico de dominio, un anticuerpo de dominio individual, un
 proteína de fusión, o un monoclonal murino. Por ejemplo, los
 5 anticuerpos anti-5T4 humanizados de la invención incluyen
 anticuerpos que comprende al menos una región variable de
 cadena pesada o al menos una región variable de cadena ligera,
 en donde el anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo:
 (a) comprende un dominio de unión a antígeno de los
 10 anticuerpos A1, A2, o A3 murinos; (b) compete para la unión de
 5T4 con los anticuerpos A1, A2, o A3 murinos; (c) se une a un
 epítipo de 5T4 unido por los anticuerpos A1, A2, o A3; o (d)
 un fragmento de unión a 5T4 de un anticuerpo de (a)-(c).

Los anticuerpos anti-5T4 de la invención tienen una
 15 afinidad de unión para el antígeno 5T4 humano de al menos
 aproximadamente 1×10^{-7} M a aproximadamente 1×10^{-12} M. Los
 anticuerpos anti-5T4 descritos y los conjugados de los mismos
 también pueden mostrar unión específica por dirección al
 objetivo de las células que expresan 5T4, *in vivo*.

20 Los anticuerpos anti-5T4 representativos de la
 invención incluyen anticuerpos que comprenden una región
 variable de cadena pesada que comprende (a) una secuencia de
 aminoácidos de los residuos 20-138 de SEQ ID NO: 2; (b) una
 secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a los
 25 residuos 20-138 de SEQ ID NO: 2; (c) una secuencia de

aminoácidos de los residuos 19-135 de SEQ ID NO: 6; (d) una
secuencia de aminoácidos que es al menos 86 % idéntica a los
residuos 19-135 de SEQ ID NO: 6; (e) una secuencia de
aminoácidos de los residuos 20-141 de SEQ ID NO: 10; (f) una
5 secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % idéntica a los
residuos 20-141 de SEQ ID NO: 10; (g) una secuencia de
aminoácidos de al menos cualquiera de SEQ ID NOS: 49, 51, 52,
54, 56, 77, 78, 81, u 82; (h) una secuencia de aminoácidos que
es al menos 91 % idéntica a SEQ ID NO: 51; (i) una secuencia
10 de aminoácidos que es al menos 78 % idéntica a SEQ ID NO: 54;
(j) una secuencia de aminoácidos que es al menos 89 % idéntica
a SEQ ID NO: 77; (k) una secuencia de aminoácidos que es al
menos 79 % idéntica a SEQ ID NO: 78; (l) una secuencia de
aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a SEQ ID NO: 81; o
15 (m) una secuencia de aminoácidos que es al menos 78 % idéntica
a SEQ ID NO: 82.

Los anticuerpos anti-5T4 representativos de la
invención incluyen anticuerpos que comprenden una región
variable de cadena ligera que comprende (a) una secuencia de
20 aminoácidos de los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 4; (b) una
secuencia de aminoácidos que es al menos 94 % idéntica a los
residuos 21-127 de SEQ ID NO: 4; (c) una secuencia de
aminoácidos de los residuos 23-130 de SEQ ID NO: 8; (d) una
secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a los
25 residuos 23-130 de SEQ ID NO: 8; (e) una secuencia de

aminoácidos de los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 12; (f) una
 secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % idéntica a los
 residuos 21-127 de SEQ ID NO: 12; (g) una secuencia de
 aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 58, 60, 62, 64,
 5 66, 68, 70, 72, 74, 76, 79, 80, 83, u 84; (h) una secuencia de
 aminoácidos que es al menos 83 % idéntica a SEQ ID NO: 60; (i)
 una secuencia de aminoácidos que es al menos 93 % idéntica a
 SEQ ID NO: 70; (j) una secuencia de aminoácidos que es al
 menos 85 % idéntica a SEQ ID NO: 76; (k) una secuencia de
 10 aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a SEQ ID NO: 76; (l)
 una secuencia de aminoácidos que es al menos 88 % idéntica a
 SEQ ID NO: 79; (m) una secuencia de aminoácidos que es al
 menos 84 % idéntica a SEQ ID NO: 80; (n) una secuencia de
 aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a SEQ ID NO: 83; u
 15 (o) una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % idéntica
 a SEQ ID NO: 84.

Por ejemplo, el anticuerpo anti-5T4 comprende (a)
 una región variable de cadena pesada que comprende una
 secuencia de aminoácidos de los residuos 20-138 de SEQ ID NO:
 20 2, y una región variable de cadena ligera que comprende una
 secuencia de aminoácidos de los residuos 21-127 de SEQ ID NO:
 4; (b) una región variable de cadena pesada que comprende una
 secuencia de aminoácidos derivada de los residuos 19-135 de
 SEQ ID NO: 6, y una región variable de cadena ligera que
 25 comprende una secuencia de aminoácidos derivada de los

residuos 23-130 de SEQ ID NO: 8; o (c) una región variable de
 cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos
 derivada de los residuos 20-141 de SEQ ID NO: 10, y una región
 variable de cadena ligera que comprende una secuencia de
 5 aminoácidos derivada de los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 12.

Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados de
 la invención pueden comprender regiones constantes derivadas
 de regiones constantes humanas, tal como una región constante
 de cadena ligera humana derivada de la región constante de
 10 cadena ligera kappa humana y una región constante de cadena
 pesada humana derivada de una región constante de cadena
 pesada de IgG4 humana o IgG1 humana.

Los anticuerpos anti-5T4 humanizados representativos
 de la invención incluyen anticuerpos que comprenden (a)
 15 regiones de estructura alterna que comprende residuos de una
 región de estructura alterna de anticuerpo humano; y (b) una o
 más CDR de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NOS:
 4, 8, ó 12, o una o más CDR de la región variable de cadena
 pesada de SEQ ID NOS: 2, 6, ó 10. Por ejemplo, los residuos
 20 de una estructura alterna de anticuerpo humano pueden
 comprender (a) un región de estructura alterna de cadena
 ligera de anticuerpo humano de un clon de línea germinal de
 subgrupo IV DPK24, un subgrupo VkIII (DPK23, DPK22, DPK20,
 DPK21), o un clon de línea germinal de subgrupo VkI (DPK9,

DPK1, 02, DPK7); (b) una región de estructura alterna de cadena pesada de anticuerpo humana seleccionada del grupo que consiste de DP-21 (VH7), DP-54 (VH3-07), DP-47 (VH3-23), DP-53 (VH-74), DP-49 (VH3-30), DP-48 (VH3-13), DP-75, DP-8 (VH1-2),
5 DP-25, VI-2b Y VI-3 (VH1-03), DP-15 y VI-8 (VH1-08), DP-14 y VI-18 (VH1-18), DP-5 y VI-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 alterna de cadena pesada de (b); o (d) una región
10 de estructura alterna que es al menos 63 % idéntica a una región de estructura alterna de (a)-(c).

Los anticuerpos anti-5T4 humanizados representativos de la invención también pueden incluir dos o más CDR de SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, ó 12, tal como dos o todas las tres CDR
15 de la región variable de cadena ligera de SEQ ID NOS: 4, 8, ó 12, o dos o todas las tres CDR de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NOS: 2, 6, ó 10, o dos o más CDR o la región variable de cadena ligera de SEQ ID NOS: 4, 8, ó 12 y una o más CDR de la región variable de cadena pesada de SEQ ID NOS:
20 2, 6, ó 12, o todas las CDR o SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, ó 12.

Los anticuerpos anti-5T4 humanizados y quiméricos representativos incluyen anticuerpos que comprenden una secuencia de la región variable de cadena pesada que comprende
25 (a) una secuencia de aminoácidos de los residuos 20-138 de SEQ

ID NO: 2; (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a los residuos 20-138 de SEQ ID NO: 2; (c) una secuencia de aminoácidos de los residuos 19-135 de SEQ ID NO: 6; (d) una secuencia de aminoácidos que es al menos 86 % idéntica a los residuos 19-135 de SEQ ID NO: 6; (e) una secuencia de aminoácidos de los residuos 20-141 de SEQ ID NO: 10; (f) una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % idéntica a los residuos 20-141 de SEQ ID NO: 10; (g) una secuencia de aminoácidos de los residuos 1-119 de SEQ ID NO: 49; (h) una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a los residuos 1-119 de SEQ ID NO: 49; o (i) una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada humanizada representada en las Figuras 9A-9C.

Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados adicionales de la invención incluyen anticuerpos que comprenden una región variable de cadena pesada codificada por un ácido nucleico que comprende (a) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-414 de SEQ ID NO: 1; (b) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 55-405 de SEQ ID NO: 5; (c) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-423 de SEQ ID NO: 9; (d) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 1-358 de SEQ ID NO: 48; (e) una secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable A1, A2, o A3 humanizada representada en las Figuras 9A-9C; (f) una secuencia de nucleótidos que es al menos 90 % idéntica a la

secuencia de nucleótidos de cualquiera de (a)-(e); o (g) un ácido nucleico que hibridiza de manera específica al complemento de cualquiera de (a)-(e) bajo condiciones de hibridación severa.

5 Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados representativos incluyen anticuerpos que comprenden una secuencia de la región variable de cadena ligera que comprende (a) una secuencia de aminoácidos de los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 4; (b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 94
10 % idéntica a los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 4; (c) una secuencia de aminoácidos de los residuos 23-130 de SEQ ID NO: 8; (d) una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a los residuos 23-130 de SEQ ID NO: 8; (e) una secuencia de aminoácidos de los residuos 21-127 de SEQ ID NO:
15 12; (f) una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % idéntica a los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 12; o (g) una secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera A1, A2, o A3 humanizada representada en las Figuras 9A-9C.

20 También se proporcionan conjugados de anticuerpo/fármaco para distribución de fármaco que comprenden (a) un anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado o fragmento de anticuerpo de la invención; y (b) un fármaco, que está unido directa o indirectamente al anticuerpo. Los fármacos
25 representativos incluyen agentes terapéuticos, tal como

citotoxinas, radioisótopos, agentes inmunomoduladores, agentes anti-angiogénicos, agentes anti-proliferativos, agentes pro-apoptóticos, agentes quimioterapéuticos, y ácidos nucleicos terapéuticos. Una citotoxina puede ser, por ejemplo, un
5 antibiótico, un inhibidor de polimerización de tubulina, un agente de alquilación, un inhibidor de síntesis de proteína, un inhibidor de proteína-quinasa, un inhibidor de fosfatasa, un inhibidor de topoisomerasa, o una enzima. Las citotoxinas de antibiótico, tal como caliqueamicina, caliqueamicina, N-
10 acetil- -caliqueamicina, o derivados de los mismos tal como N-acetil- -caliqueamicina-dimetil-hidrazida, son particularmente útiles para terapias anticancerígenas.

Los conjugados de anticuerpos anti-5T4/fármaco, descritos, pueden incluir un ligador para la unión del
15 anticuerpo al fármaco. Los ligadores representativos incluyen ácido 4-(4'acetilfenoxi)butanoico (AcBut), ácido 3-acetilfenil-acídico (AcPac), y ácido 4-mercapto-4-metil-petanoico (Amida). Los conjugados de anticuerpo/fármaco pueden incluir también polietilenglicol u otros agentes para
20 mejorar la incorporación del fármaco.

Para la distribución de un fármaco a células que expresan 5T4, la presente invención proporciona métodos por los que las células se ponen en contacto con un conjugado de anticuerpo/fármaco que comprende (i) un anticuerpo anti-5T4

quimérico o humanizado, y (ii) un fármaco que se une directa o indirectamente al anticuerpo anti-5T4 humanizado. De acuerdo a los métodos descritos, el fármaco se internaliza dentro de la célula objetivo. Los métodos terapéuticos también se describen en la presente, que comprenden administrar al sujeto que tiene un cáncer positivo a 5T4, una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de anticuerpo anti-5T4/fármaco que comprende (i) un anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado, o fragmento de anticuerpo, y (ii) un agente terapéutico que se une al anticuerpo anti-5T4 humanizado o fragmento de anticuerpo directa o indirectamente. Las terapias anti-5T4 de la invención se pueden combinar con cualquier otra terapia conocida para efecto mejorado. Se puede administrar un segundo agente terapéutico en combinación con un conjugado de anticuerpo anti-5T4/fármaco simultáneamente o de manera consecutiva en cualquier orden.

También se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican para regiones variables anti-5T4 humanizadas, que son útiles para la producción de los anticuerpos anti-5T4 humanizados descritos. Los ácidos nucleicos representativos que codifican para una región variable de cadena pesada anti-5T4 humanizada incluyen (a) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-414 de SEQ ID NO: 1; (b) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 55-405 de SEQ ID NO: 5; (c) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-423 de SEQ ID

NO: 9; (d) una secuencia de nucleótidos que codifica para cualquiera de SEQ ID NOS: 48, 50, 53, ó 55; (e) una secuencia de nucleótidos que es 89 % idéntica a SEQ ID NO: 50 cuando la cobertura de búsqueda es 100 %; (f) una secuencia de
5 nucleótidos que es 82 % idéntica a SEQ ID NO: 53 cuando la cobertura de búsqueda es 100 %; o (g) un ácido nucleico que hibridiza específicamente al complemento de cualquiera de (a)-(d) bajo condiciones de hibridación severa. Los ácidos nucleicos representativos que codifican para una región
10 variable de cadena ligera anti-5T4 humanizada incluyen (a) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 61-381 de SEQ ID NO: 3; (b) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 67-390 de SEQ ID NO: 7; (c) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 61-381 de SEQ ID NO: 11; (d) una secuencia de
15 nucleótidos que codifica para una región variable de cadena ligera A1, A2, o A3 humanizada de cualquiera de SEQ ID NOS: 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, ó 75; (e) una secuencia de nucleótidos que es 84 % idéntica a SEQ ID NO: 59 cuando la cobertura de búsqueda es 100 %; (f) una secuencia de
20 nucleótidos que es 86 % idéntica a SEQ ID NO: 69 cuando la cobertura de búsqueda es 100 %; (g) una secuencia de nucleótidos que es 85 % idéntica a SEQ ID NO: 75 cuando la cobertura de búsqueda es 100 %; o (h) un ácido nucleico que hibridiza de manera específica al complemento de cualquiera de
25 (a)-(d) bajo condiciones de hibridación severas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A-1C muestran las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos A1, A2, y A3 anti-
5 5T4 murinos. Las secuencias de aminoácidos se anotan para identificar regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) por subrayado y la secuencia guía por doble subrayado.

La Figura 2 es una transferencia Western preparada
10 usando los lisados celulares CT26/5T4, y sondeada con los anticuerpos indicados.

Las Figuras 3A-3B son gráficas lineales que muestran las curvas de respuesta y las cinéticas de unión para dos preparaciones independientes de los anticuerpos H8 y A1. Las
15 preparaciones son sustancialmente equivalentes.

Las Figuras 4A-4C son gráficas lineales que muestran la modulación de los anticuerpos H8, A1, A2, y A3 por células MDAMB435/5T4. Los niveles del anticuerpo en la superficie celular declinan durante el tiempo (Figuras 4A, 4C (sólida)),
20 en tanto que los niveles del anticuerpo en el sobrenadante permanecen constantes (Figuras 4B, 4C (abierta)), MCF, fluorescencia celular media; supt, sobrenadante.

La Figura 5 es un diagrama esquemático de la construcción Fc de 5T4 de ectodominio humano, la construcción
25 Fc de 5T4 de ectodominio de ratón, y las construcciones de

quimera de 5T4 de humano/ratón. Estas construcciones se usaron para correlación de epítomos como se describe en el Ejemplo 4.

Las Figuras 6A-6B muestran resultados gráficos de la unión competitiva de H8 humanizado y cada uno de los anticuerpos indicados a la proteína de fusión Fc de ectodominio de 5T4 humano. HuH8, anticuerpo H8 humanizado; ChiA1, anticuerpo A1 quimérico, ChiA1+C67F, anticuerpo A1 quimérico que tiene mutación C67F; ChiA2, anticuerpo A2 quimérico; muA2, anticuerpo A2 murino; ChiA3, anticuerpo A3 quimérico; ChiA3+C91Y, anticuerpo A3 quimérico que tiene la mutación C91Y, muA3, anticuerpo A3 murino; No Ab, ningún anticuerpo (control).

La Figura 7 es un diagrama lineal que muestra los epítomo de 5T4 humano unidos por H8, A1, A2, y A3. Los residuos indicados son residuos del antígeno 5T4 descrito por Myers et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269 (12): 9319-9324, también disponible como acceso de GenBank Número Z29083 (SEQ ID NO: 87). LRR, repetición de alto contenido de Leucina.

La Figura 8 muestra los resultados de ensayos de esferoides realizados como se describe en el Ejemplo 6. Los conjugados de anti-5T4/caliqueamicina preparados usando los anticuerpos A1 y A3 inhiben significativamente el crecimiento de células que expresan 5T4 (MDAMB435/5T4) en comparación a células de control (MDAMB435/neo). CMA-676, conjugado anti-

CD33/caliqueamicina; huH8-AcBut-CalichDMH, anticuerpo H8 humanizado conjugado a caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut); CalichDMH, caliqueamicina no conjugada; A1-AcBut-CalichDMH, anticuerpo A1 conjugado a
5 caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut); A3-AcBut-CalichDMH, anticuerpo A3 conjugado a caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut).

Las Figuras 9A-9H muestran secuencias de nucleótidos
10 y aminoácidos de la región variable versión 1 de cadena pesada A1 humanizada (SEQ ID NOS: 48-49); secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada A1 humanizada (huA1 VH) versiones 1.2 y 2.0; secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera A1 humanizada (huA1 VL) versiones
15 1.0, 2.0, y 3.0; secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada A2 humanizada, versiones 1.0 y 2.0 (huA2 VH); secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera A2 humanizada, versiones 1.0 y 2.0 (huA2 VL); secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena
20 pesada A3 humanizada, versiones 1.0 y 2.0 (huA3 VH); y secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena ligera A3 humanizada, versiones 1.0 y 2.0 (huA32 VL). Están subrayadas las CDR.

Las Figuras 10A-10B muestran secuencias de
25 estructura alterna de la región variable de cadena pesada

humanas representativas que se pueden usar para preparar anticuerpos anti-5T4 humanizados. La Figura 10A es una alineación de las secuencias de la región variable de cadena pesada humana del subgrupo I (SEQ ID NOS: 14-24) y las 5 secuencias de estructura alterna de consenso derivadas de éstas (SEQ ID NOS: 25-27). La Figura 10B muestra las secuencias de los genes de línea germinal humana de los subgrupos VH 7 y VH 3 (SEQ ID NOS: 88-93).

La Figura 11 es una alineación de las secuencias de 10 la región variable de cadena ligera humana del subgrupo VKIII (SEQ ID NOS: 29-34). Secuencias en cuadro, CDR.

La Figura 12 es una alineación de las secuencias de la región variable de cadena ligera humana del subgrupo VKI (SEQ ID NOS: 35-44). Secuencias en cuadro, CDR.

15 La Figura 13 muestra secuencias de línea germinal humana adicional de los subgrupos Vk 1 y Vk IV, que tienen regiones de estructura alterna que se pueden usar para preparar anticuerpos anti-5T4 humanizados (SEQ ID NOS: 94-99).

20 La Figura 14 muestra las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes humanas representativas que se pueden usar para preparar anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados (SEQ ID NOS: 45-47).

La Figura 15 muestra las secuencias de aminoácidos de un antígeno 5T4 de mono cynomologus de longitud completa y 25

un antígeno 5T4 parcial de mono tití de cola negra. Las secuencias subrayadas, son secuencias guía. Para cada secuencia, el ectodominio de 5T4 incluye los aminoácidos 30-356.

5

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. Anticuerpos anti-5T4

La presente invención proporciona nuevos anticuerpos murinos que se unen al antígeno 5T4 humano y que son útiles para desarrollar inmunoterapia dirigidas. El antígeno 5T4 humano es una fosfoproteína no glicosilada de 72 kDa encontrada en la superficie de células de trofoblastos y numerosos tipos de células cancerígenas. Ver Hole et al. (1988) *Br. J. Cancer* 57: 239-46, Hole et al. (1990) *Int. J. Cancer* 45: 179-184; Publicación Internacional PCT Número WO 89/07947; Patente de los Estados Unidos Número 5,869,053.

Los anticuerpos anti-5T4 murinos de la invención se designan A1, A2, y A3, y se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. También se proporcionan anticuerpos anti-5T4 derivados de A1, A2, y A3, que se unen específicamente al antígeno 5T4 humano. Por ejemplo, los anticuerpos anti-5T4 de la invención incluyen anticuerpos que comprenden residuos de unión a antígeno de los anticuerpos A1, A2, y A3; anticuerpos que compiten para la unión al antígeno 5T4 con anticuerpos A1, A2, o A3; y anticuerpos que se unen al mismo epítipo 5T4 como

los anticuerpos A1, A2, o A3.

En particular, los anticuerpos A1, A2, y A3 descritos comprenden cada uno, un sitio de unión a antígeno que reconocen un epítipo único en el antígeno 5T4 humano. Cada uno de estos anticuerpos también se une a un epítipo distinto de aquél encontrado por H8, y cada uno de A1, A2, y A3 falla en competir con el anticuerpo H8 para la unión a 5T4 humano. Ver ejemplos 4-5 y Figura 6-7. Por consiguiente, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen de manera específica a los residuos 30-163 de 5T4 humano (por ejemplo, A3), anticuerpos que se unen de manera específica a los residuos 224-276 de 5T4 humano (por ejemplo, A1), y anticuerpos que se unen de manera específica a los residuos 224-355 de 5T4 humano (por ejemplo, A2). También se proporcionan antígenos 5T4 humanos que comprenden epítopos unidos por un anticuerpo A1, A2, o A3. Por ejemplo, la invención proporciona fragmentos antigénicos de 5T4 que comprenden los residuos 30-163, 224-276, y 224-355 de un antígeno 5T4 nativo o de longitud completa.

La unión específica de los anticuerpos anti-5T4 descritos, se refiere a una unión preferencial de un anticuerpo al antígeno 5T4 humano en una muestra heterogénea, que comprende múltiples antígenos diferentes. Típicamente, la unión específica se presenta si la afinidad de unión es 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
5 a un antígeno 5T4 humano incluye la unión en el intervalo de
al menos aproximadamente 1×10^{-7} M a aproximadamente 1×10^{-12}
M, tal como dentro del intervalo de aproximadamente 1×10^{-8} M
a aproximadamente 1×10^{-12} M, o dentro del intervalo de
aproximadamente 1×10^{-8} M a aproximadamente 1×10^{-11} M, o
10 dentro del intervalo de aproximadamente 1×10^{-8} M a
aproximadamente 1×10^{-10} M, o dentro del intervalo de
aproximadamente 1×10^{-9} M a aproximadamente 1×10^{-10} M. La
unión específica también se refiere a dirección selectiva al
objetivo de un anticuerpo anti-5T4 a células que expresan 5T4
15 después de la administración del anticuerpo a un sujeto.

Los anticuerpos anti-5T4 de la invención pueden
tener una estructura tetramérica (por ejemplo, similar a los
anticuerpos que se presentan de manera natural), o pueden
comprender cualquier otra estructura que tenga al menos una
20 región variable de cadena ligera de inmunoglobulina o al menos
una región de cadena pesada de inmunoglobulina, o fragmentos
de unión a 5T4 de los mismos (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab
modificado, $F(ab')_2$ o Fv). También se incluyen anticuerpos de
dominio individual, en los cuales una o más regiones
25 determinantes de complementariedad (CDR) pero menos que todas

las seis CDR, constituye una región de unión a antígeno. La invención también abarca anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos superhumanizados, diacuerpos, anticuerpos de cadena individual, anticuerpos tetravalentes, y/o anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). Estos descriptores de anticuerpos no son mutuamente exclusivos.

Los anticuerpos que se presentan de manera natural son glicoproteínas tetraméricas (H_2L_2) de aproximadamente 150,000 dáltones, compuestas de dos cadenas ligeras idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Las dos cadenas pesadas se enlazan entre sí por enlaces de disulfuro y cada cadena pesada se enlaza a una cadena ligera por un enlace de disulfuro. Cada una de las cadenas ligera y pesada se caracteriza además por una región variable amino-terminal y una región constante. Las regiones variables incluyen secuencias que difieren extensivamente entre anticuerpos y determinan sustancialmente la afinidad de unión y la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Las regiones variables de cada una de las cadenas ligera y pesada se alinean para formar el dominio de unión a antígeno.

Los anticuerpos quiméricos comprenden secuencias de al menos dos especies diferentes. Como un ejemplo, se pueden usar técnicas de clonación recombinante para incluir regiones

variables, que contiene los sitios de unión a antígeno, de un anticuerpo no humano (es decir, un anticuerpo preparado en una especie no humana inmunizada con el antígeno) y regiones constantes derivadas de una inmunoglobulina humana.

5 Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos de la invención incluyen anticuerpos que comprenden regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos A1, A2, y A3, es decir, (a) una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de los residuos 20-138 de SEQ ID
10 NO: 2 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 4; (b) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de los residuos 19-135 de SEQ ID NO: 6 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de los residuos 23-130 de SEQ ID NO: 8; y (c)
15 una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de los residuos 20-141 de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 12. Los anticuerpos anti-5T4 humanizados representativos pueden incluir una región variable de cadena pesada expuesta como
20 para los aminoácidos 1-119 de SEQ ID NO: 49, o cualquiera de la región variable de cadena pesada humanizada representada en las Figuras 9A-9C, y una región variable de cadena ligera humanizada, también representada en las Figuras 9A-9C. En el Ejemplo 7 se describe la preparación de anticuerpos anti-5T4
25 quiméricos y humanizados representativos de la invención.

Los anticuerpos anti-5T4 de la invención también pueden comprender una región variable de cadena pesada y/o cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que se deriva de o es sustancialmente similar a las regiones variables A1, A2, o A3, o sustancialmente similar a las regiones variables A1, A2, y A3 humanizadas. Con respecto a las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera, sustancialmente idénticas, las secuencias sustancialmente idénticas son al menos aproximadamente 90 % idénticas a las secuencias de región variable de cualquiera de SEQ ID NOS: 1-12 o a las regiones variables A1, A2, y A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C, tal como al menos 91 % idénticas, o al menos 92 % idénticas, o al menos 93 % idénticas, o al menos 94 % idénticas, o al menos 95 % idénticas, o al menos 96 % idénticas, o al menos 97 % idénticas, o al menos 98 % idénticas, o al menos 99 % idénticas.

Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos representativos de la invención, es decir, anticuerpos que se unen específicamente al antígeno 5T4, también incluyen aquellos anticuerpos que tienen (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada expuesta como los residuos 20-138 de SEQ ID NO: 2, los residuos 19-135 de SEQ ID NO: 6, residuo 20-141 de SEQ ID NO: 10, o cualquiera de las regiones variables de cadena pesada A1, A2, o A3 humanizadas

representadas en las Figuras 9A-9C; (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que es al menos 85 % idéntica a los residuos 20-138 de SEQ ID NO: 2; (c) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que es al menos 86 % idéntica a los residuos 19-135 de SEQ ID NO: 6; (d) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que es al menos 91 % idéntica a los residuos 20-141 de SEQ ID NO: 10; (e) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada que es al menos 90 % idéntica a los residuos 1-119 de SEQ ID NO: 49; o (f) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada derivada de cualquiera de las regiones variables A1, A2, o A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C.

Una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-5T4 quimérico o humanizado, que se une específicamente al antígeno 5T4, se puede codificar por (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-414 de SEQ ID NO: 1, nucleótidos 55-405 de SEQ ID NO: 5, nucleótidos 58-423 de SEQ ID NO: 9, nucleótidos 1-358 de SEQ ID NO: 48; o un ácido nucleico que codifica para una región variable de cadena pesada A1, A2, o A3 humanizada representada en las Figuras 9A-9C; (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 90 % idéntica a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-414 de SEQ ID NO: 1,

nucleótidos 55-405 de SEQ ID NO: 5, nucleótidos 58-423 de SEQ ID NO: 9. Por ejemplo, una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-5T4 quimérico se puede codificar por un ácido nucleico que es al menos 98 % idéntico a los nucleótidos 58-414 de SEQ ID NO: 1, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 98 % idéntica a los nucleótidos 55-405 de SEQ ID NO: 5, o un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 89 % idéntica a los nucleótidos 1-358 de SEQ ID NO: 48. una región variable de cadena pesada de un anticuerpo anti-5T4 quimérico también se puede codificar por un ácido nucleico que hibridiza de manera específica al complemento de un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-414 de SEQ ID NO: 1, nucleótidos 55-405 de SEQ ID NO: 5, nucleótidos 58-423 de SEQ ID NO: 9, o nucleótidos 1-358 de SEQ ID NO: 48, bajo condiciones de hibridación severa, por ejemplo condiciones de lavado final de 0.1X SSC a 65°C.

Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos representativos de la invención incluyen además aquellos anticuerpos que tienen (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera expuesta como los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 4, los residuos 23-130 de SEQ ID NO: 8, los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 12, o los residuos de una región variable de cadena ligera A1, A2, o A3 humanizada representada en las Figuras 9A-9C; o (b) una secuencia de aminoácidos de la región variable

de cadena ligera que es al menos 90 % idéntica a los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 4, los residuos 23-130 de SEQ ID NO: 8, o los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 12. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera puede comprender (a) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera que es al menos 94 % idéntica a los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 4; (b) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera que es al menos 96 % idéntica a los residuos 23-130 de SEQ ID NO: 8; (c) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera que es al menos 98 % idéntica a los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 12; (d) o una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera derivada de cualquiera de las regiones variables de cadena ligera A1, A2, o A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C.

Una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-5T4 quimérico, que se une de manera específica al antígeno 5T4, se puede codificar por (a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 61-381 de SEQ ID NO: 3, los nucleótidos 67-390 de SEQ ID NO: 7, los nucleótidos 61-381 de SEQ ID NO: 11, o los nucleótidos que codifican para cualquiera de las regiones variables de cadena ligera A1, A2, o A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C; o (b) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 90 % idéntica a los

nucleótidos 61-381 de SEQ ID NO: 3, los nucleótidos 67-390 de SEQ ID NO: 7, o los nucleótidos 61-381 de SEQ ID NO: 11. Por ejemplo, una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-5T4 quimérico se puede codificar por un ácido nucleico que comprende (a) una secuencia de nucleótidos que es al menos 97 % idéntica a los nucleótidos 61-381 de SEQ ID NO: 3; (b) una secuencia de nucleótidos que es al menos 98 % idéntica a los nucleótidos 67-390 de SEQ ID NO: 7; o (c) una secuencia de nucleótidos que es al menos 99 % idéntica a los nucleótidos 61-381 de SEQ ID NO: 11. Una región variable de cadena ligera de un anticuerpo anti-5T4 quimérico, que se une de manera específica al antígeno 5T4, también se puede codificar por un ácido nucleico que hibridiza específicamente al complemento de un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 61-381 de SEQ ID NO: 3, nucleótidos 67-390 de SEQ ID NO: 7, o nucleótidos 61-381 de SEQ ID NO: 11, bajo condiciones de hibridación severas, por ejemplo condiciones de lavado final de 0.1X SSC a 65°C.

Los anticuerpos humanizados son un tipo de anticuerpo quimérico en donde los residuos de región variable responsables de la unión al antígeno (es decir, los residuos de una región determinante de complementariedad, abreviada región determinante de complementariedad, o cualquier otro residuo que participe en la unión al antígeno) se derivan de una especie no humana, en donde los residuos restantes de

región variable (es decir, los residuos de las regiones de estructura alterna) y las regiones constantes se derivan, al menos en parte, de secuencias de anticuerpo humanas. Un subconjunto de residuos de región de estructura alterna y
5 residuos de región constante de un anticuerpo humanizado 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). La especie no humana es típicamente
10 aquélla usada para inmunización con antígeno, tal como ratón, rata, conejo, primate no humano, u otra especie mamífera no humana. Los anticuerpos humanizados típicamente son menos inmunogénicos que los anticuerpos quiméricos tradicionales y muestran estabilidad mejorada después de la administración a
15 humanos. Ver, por ejemplo, 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.

Las regiones determinantes de complementariedad
20 (CDR) son residuos de regiones variables de anticuerpo que participan en la unión al antígeno. Están en uso común varios sistemas de numeración para identificar las CDR. La definición de Kabat se basa en la variabilidad de secuencia, y la definición de Chothia se basa en la ubicación de las
25 regiones de asa estructurales. La definición AbM es un

compromiso entre los planteamientos de Kabat y Chothia. Las CDR de la región variable de cadena ligera se unen por los residuos en las posiciones 24 y 34 (CDR1-L), 50 y 56 (CDR2-L), y 89 y 97 (CDR3-L) de acuerdo al algoritmo de Kabat, Chothia, o AbM. De acuerdo a la definición de Kabat, las CDR de la región variable de cadena pesada se unen por 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, las CDR de la región variable de cadena pesada se unen por 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 de AbM, las CDR de la región variable de cadena pesada se unen por 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. EUA* 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.

Las regiones determinantes de especificidad (SDR, por sus siglas en inglés) son residuos dentro de las CDR que interactúan directamente con el antígeno. Las SDR corresponden a los residuos hipervariables. Ver (Padlan et al. (1995) *FASEB J.* 9: 133-139).

Los residuos de estructura alterna son aquellos residuos de las regiones variables de anticuerpo diferentes de los residuos hipervariables o de CDR. Los residuos de estructura alterna se pueden derivar de un anticuerpo humano que se presenta de manera natural, tal como una estructura alterna humana que es sustancialmente similar a una región de estructura alterna de los anticuerpos A1, A2, o A3. Las secuencias de estructura alterna artificiales que representan un consenso entre secuencias individuales también se pueden usar. Cuando se selecciona una región de estructura alterna para humanización, las secuencias que se representan ampliamente en humanos se pueden preferir con respecto a secuencias menos populosas. Se pueden hacer mutaciones adicionales de las secuencias aceptadoras de estructura alterna humanas para restaurar residuos murinos que se cree que están comprendidos en los contactos a antígeno y/o residuos comprendidos en la integridad estructural del sitio de unión a antígeno, o para mejorar la expresión del anticuerpo. Se puede usar una predicción de estructura peptídica para analizar las secuencias de región pesada y ligera, variables, humanizadas para identificar y evitar sitios de modificación de proteína post-transduccionales introducidos por el diseño de humanización.

Se puede preparar anticuerpos humanizados usando cualquiera de una variedad de métodos incluyendo chapado,

injerto de regiones determinantes de complementariedad (CDR),
injerto de CDR abreviadas, injerto de regiones determinantes
de especificidad (SDR), y montajes Frankenstein, como se
describe más adelante. Los anticuerpos humanizados también
5 incluyen anticuerpos superhumanizados, en los cuales se han
introducido uno o más cambios en las CDR. Por ejemplo, los
residuos humanos se pueden sustituir por residuos no humanos
en las CDR. Estos planteamientos generales se pueden combinar
con técnicas normales de mutagénesis y síntesis para producir
10 un anticuerpo anti-5T4 de cualquier secuencia deseada.

El chapado se basa en el concepto de reducir
secuencias de aminoácidos potencialmente inmunogénicas en un
anticuerpo de roedor u otro no humano al hacer re-surgir el
exterior accesible solvente del anticuerpo con secuencias
15 humanas de aminoácidos. De esta manera, los anticuerpos
chapados parecen menos extraños a células humanas que el
anticuerpo no humano, no modificado. Ver Padlan (1991) *Mol.*
Immunol. 28: 489-98. Un anticuerpo no humano se chapea al
identificar residuos expuestos exteriores de la región de
20 estructura alterna en el anticuerpo no humano, que son
diferentes de aquéllos en las mismas posiciones en las
regiones de estructura alterna de un anticuerpo humano, y el
reemplazo de los residuos identificados con aminoácidos que
ocupan típicamente estas mismas posiciones en los anticuerpos
25 humanos.

El injerto de CDR se realiza al reemplazar una o más CDR de un anticuerpo aceptador (por ejemplo, un anticuerpo humano u otro anticuerpo que comprende residuos de estructura alterna, deseados) con CDR de un anticuerpo donador (por ejemplo, un anticuerpo no humano). Se pueden seleccionar anticuerpos aceptadores en base a la similitud de los residuos de estructura alterna entre un anticuerpo aceptador candidato y un anticuerpo donador. Por ejemplo, de acuerdo al planteamiento Frankenstein, se identifican regiones humanas de estructura alterna como que tienen homología sustancial de secuencia a cada región de estructura alterna del anticuerpo no humano pertinente, y las CDR del anticuerpo no humano se injertan en el producto compuesto de las diferentes regiones de estructura alterna, humanas. En la publicación de solicitud de Patente de los Estados Unidos Número 2003/0040606 se describe un método relacionado también útil para la preparación de anticuerpo de la invención.

El injerto de CDR abreviadas es un planteamiento relacionado. Las CDR abreviadas incluyen residuos determinantes de especificidad y aminoácidos adyacentes, incluyendo 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 residuos determinantes de especificidad (SDR) se

supone en el entendimiento que la especificidad de unión y la afinidad de un sitio de combinación de anticuerpos se determina por los residuos más altamente variables dentro de cada una de las regiones determinantes de complementariedad (CDR). El análisis de las estructuras tridimensionales de los complejos de anticuerpo-antígeno, combinado con el análisis de los datos disponibles de secuencias de aminoácidos, se puede usar para modelar la variabilidad de secuencia en base a la disimilitud estructural de los residuos de aminoácido que se presentan en cada posición dentro de la CDR. Se identifican SDR como secuencias de polipéptido mínimamente inmunogénicas que consisten de residuos de contacto. Ver Padlan et al. (1995) *FASEB J.* 9: 133-139.

En general, las estructuras alternas aceptadoras humanas se seleccionan en base a que son sustancialmente similares a las regiones de estructura alterna de los anticuerpos donadores, o que son muy similares a las secuencias de consenso de la subfamilia de regiones variables. Después del injerto, se pueden hacer cambios adicionales en las secuencias donadoras y/o aceptadoras para optimizar la unión del anticuerpo, la funcionalidad, el uso de codones, los niveles de expresión, etc., incluyendo la introducción de residuos no humanos en las regiones de estructura alterna. Ver, por ejemplo, la Publicación Internacional PCT Número WO 91/09967.

Para el injerto de las CDR en una región de estructura alterna variable de cadena pesada, se pueden derivar secuencias útiles de estructura alterna de un DP-21 (VH7), DP-54 (VH3-07), DP-47 (VH3-23), DP-53 (VH-74), DP-49 (VH3-30), DP-48 (VH3-13), 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 e YAC-7 (VH1-69), DP-88 (VH1-e), DP-3 y DA-8 (VH1-f). Las regiones variables de cadena pesada representativas que contienen residuos de estructura alterna para humanización se exponen como SEQ ID NOS: 13-24 y 88-93. Las estructuras alternas representativas que representan un consenso de los residuos de estructura alterna de VH1 se exponen como SEQ ID NOS: 25-27. Ver también Figuras 10A-10B.

Para el injerto de CDR en una región de estructura alterna variable de cadena ligera, se pueden derivar secuencias útiles de estructura alterna de un clon de línea germinal del subgrupo IV DPK24, un subgrupo VKIII (DPK23, DPK22, DPK20, DPK21), o un clon de línea germinal del subgrupo VKI (DPK9, DPK1, O2, DPK7). Las regiones variables de cadena ligera representativas que contienen residuos de estructura alterna para humanización se exponen como SEQ ID NOS: 28-34, 35-44, y 94-99. Ver Figuras 11-14.

Los anticuerpos anti-5T4 humanizados representativos

de la invención incluyen anticuerpos que tiene una o más CDR de un anticuerpo anti-5T4 no humano seleccionado de CDR de una región variable de cadena pesada de cualquiera de SEQ ID NOS: 2, 6, ó 10, o una región variable de cadena ligera de cualquiera de SEQ ID NOS: 4, 8, ó 12. Por ejemplo, los anticuerpos anti-5T4 humanizados pueden comprender dos o más CDR seleccionadas de CDR de una región variable de cadena pesada de cualquiera de SEQ ID NOS: 2, 6, ó 10, o una región variable de cadena ligera de cualquiera de SEQ ID NOS: 4, 8, ó 12. También, los anticuerpos anti-5T4 humanizados pueden comprender una cadena pesada que comprende una región variable que tiene dos o tres CDR de cualquiera de SEQ ID NOS: 2, 6, ó 10, y una cadena ligera que comprende una región variable que tiene dos o tres CDR de cualquiera de SEQ ID NOS: 4, 8, ó 12.

Los anticuerpos anti-5T4 humanizados de la invención se pueden construir en donde la región variable de una primera cadena (es decir, la región variable de cadena ligera o la región variable de cadena pesada) se humaniza, y en donde no se humaniza la región variable de la segunda cadena (es decir, una región variable de un anticuerpo producido en una especie no humana). Estos anticuerpos son de un tipo de anticuerpo humanizado referido como anticuerpos semi-humanizados. Los anticuerpos anti-5T4 no humanos que se pueden usar para preparar anticuerpos semi-humanizados incluyen los anticuerpos A1, A2, y A3, como se describe en la presente, así como el

anticuerpo H8 descrito en la Publicación Internacional PCT
Número WO 98/55607 y en Forsberg et al. (1997) *J. Biol. Chem.*
272(19: 124430-12436, o el anticuerpo monoclonal de rata
descrito en Woods et al. (2002) *Biochem. J.* 366: 353-65). Por
5 ejemplo, un anticuerpo anti-5T4 semi-humanizado puede
comprender una región variable de cadena pesada expuesta como
los aminoácidos 1-119 de SEQ ID NO: 49 o los aminoácidos de
una región variable de cadena pesada A1, A2, o A3 humanizada
representada en las Figuras 9A-9C, y una región variable de
10 cadena ligera de cualquiera de SEQ ID NOS: 4, 8, ó 12.

Las regiones constantes de los anticuerpos anti-5T4
quiméricos y humanizados se pueden derivar de regiones
constantes de cualquiera de IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, cualquier
isotipo de las mismas (por ejemplo, los isotipos IgG1, IgG2,
15 IgG3, o IgG4 de la IgG), así como versiones mutadas de las
mismas. La elección de un isotipo humano y modificación de
aminoácidos particulares en el isotipo puede mejorar o
eliminar la activación de los mecanismos de defensa del
hospedador y alterar la biodistribución de los anticuerpos.
20 Ver (Reff. et al. (2002) *Cancer Control* 9: 152-66). Las
regiones constantes representativas útiles para preparar
anticuerpos quiméricos y humanizados de la invención se
exponen como SEQ ID NOS: 45-47. Las regiones constantes de
cadena ligera lamda humanas, incluidas versiones variantes o
25 mutantes, también se pueden usar. Para la clonación de

secuencias que codifican para regiones constantes de inmunoglobulina, se pueden suprimir las secuencias intrónicas.

Los anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados se pueden construir usando técnicas normales conocidas. Por ejemplo, se pueden preparar regiones variables al fijar conjuntamente oligonucleótido de traslape que codifican para las regiones variables y ligarlos en un vector de expresión que contiene una región constante de anticuerpo humano. Ver, por ejemplo, Harlow & Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York y Patentes de los Estados Unidos Números 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, incluyendo homodímeros y heterodímeros, se pueden preparar, por ejemplo, como se describe en la Publicación Internacional PCT Número WO 02/096948. También se pueden preparar dímeros de anticuerpos mediante la introducción de residuos de cisteína en la región constante de anticuerpo, que promueve la formación de enlaces de disulfuro inter-cadena, por el uso de reticuladores heterobifuncionales (Wolff et al. (1993) *Cancer Res.* 53: 2560-5), o por producción recombinante para incluir una región constante dual (Stevenson et al. (1989) *Anticancer Drug Des.* 3: 219-30). Los fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos de la invención se

pueden preparar, por ejemplo, por expresión de secuencias truncadas de anticuerpo, o por digestión de post-transducción de anticuerpos de longitud completa.

Las variantes de los anticuerpos anti-5T4 de la
5 invención, es decir los anticuerpos A1, A2, y A3, así como las versiones quiméricas y humanizadas de los mismos, se pueden preparar fácilmente para incluir varios cambios, sustituciones, inserciones, y supresiones. Por ejemplo, se pueden optimizar secuencias de anticuerpo para el uso de
10 codones en el tipo celular usado para expresión de anticuerpo. Para incrementar la vida media en suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión a receptor de salvamento, si no está presente ya, en la secuencia de cadena pesada del anticuerpo. Ver Patente de los Estados Unidos Número
15 5,739,277. Las modificaciones adicionales para mejorar la estabilidad del anticuerpo incluyen modificación de IgG4 para reemplazar la serina en el residuo 241 con prolina. Ver Angal et al. (1993) *Mol. Immunol.* 30: 105-108. Otros cambios útiles incluyen sustituciones como se requiera para optimizar la
20 eficiencia en la conjugación del anticuerpo con un fármaco. Por ejemplo, se puede modificar un anticuerpo en su término carboxilo para incluir aminoácidos para la unión al fármaco, por ejemplo, se pueden adicionar uno o más residuos de cisteína. Las regiones constantes se pueden modificar para
25 introducir sitios para la unión de carbohidratos u otras

porciones.

Las variantes de los anticuerpos anti-5T4 de la invención se pueden producir usando técnicas recombinantes normales, incluyendo mutagénesis dirigida al sitio, o clonación por recombinación. Se puede preparar un repertorio diversificado de anticuerpos anti-5T4 mediante arreglo génico y métodos de conversión génica en animales no humanos transgénicos (Publicación de Patente de los Estados Unidos Número 2003/0017534), que entonces se prueban para actividades pertinentes usando ensayos funcionales. En modalidades particulares de la invención, se obtienen variantes anti-5T4 usando un protocolo de maduración por afinidad para mutar CDR (Yang et al. (1995) *J. Mol. Biol.* 254: 392-403), transposición de cadena (Marks et al. (1992) *Biotechnology* (NY) 10: 779-783), uso de cepas mutadoras de *E. coli* (Low et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 260: 359-368), trasposición de ADN (Patten et al. (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 724-733), visualización en fagos (Thompson et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 256: 77-88), y PCR sexual (Crameri et al. (1998) *Nature* 391: 288-291). Para aplicaciones de inmunoterapia, los ensayos funcionales pertinentes incluyen la unión específica al antígeno 5T4 humano, internalización de anticuerpos, y dirección a sitios de tumor cuando se administra a un animal que tiene un tumor, como se describe más adelante en la presente.

La presente invención proporciona además células y

líneas celulares que expresan anticuerpos anti-5T4 de la invención. Las células hospedadoras representativas incluyen células de mamífero y humanas, tal como células CHO, células HEK-293, células HeLa, células CV-1, y células COS. Los métodos para generar una línea celular estable después de la transformación de una construcción heteróloga en un hospedadora se conocen en la técnica. Las células hospedadoras no mamíferas representativas incluyen células de insecto (Potter et al. (1993) *Int. Rev. Immunol.* 10(2-3): 103-112). También se pueden producir anticuerpos en animales transgénicos (Houdebine (2002) *Curr. Opin. Biotechnol.* 13(6): 625-629) y plantas transgénicas (Schillberg et al. (2003) *Cell Mol. Life Sci.* 60(3): 433-45).

15 II. Ácidos Nucleicos y Polipéptidos anti-5T4

La presente invención proporciona además ácidos nucleicos aislados que codifican para regiones variables de cadena pesada y cadena ligera anti-5T4, y polipéptidos aislados codificados por los ácidos nucleicos descritos. Los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención incluyen las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las regiones variables A1, A2, y A3, las regiones variable A1, A2, y A3 humanizados, y variantes de los mismos. Los ácidos nucleicos aislados y los polipéptido se pueden usar para preparar anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados.

II.A. Ácidos Nucleicos anti-5T4

Los ácidos nucleicos son desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma de hebra individual, doble hebra o triple. A menos que se limite de manera específica, los ácidos nucleicos pueden contener análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades similares como el ácido nucleico natural de referencia. Los ácidos nucleicos incluyen genes, ADNc, ARNm, y ARNc. Los ácidos nucleicos se pueden sintetizar, o se pueden derivar de cualquier fuente biológica, incluyendo cualquier organismo. Los métodos representativos para clonar ácidos nucleicos que codifican para anticuerpos anti-5T4 se describen en los Ejemplos 1 y 7.

Los ácidos nucleicos representativos de la invención comprenden la secuencia de nucleótidos de cualquiera de SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, y 48. En particular, los ácidos nucleicos que codifican para las regiones variables de cadena pesada A1, A2, y A3 comprenden los nucleótidos 58-41 de SEQ ID NO: 1, los nucleótidos 55-405 de SEQ ID NO: 5, y los nucleótidos 58-423 de SEQ ID NO: 9, respectivamente, que codifican para las regiones variables de cadena pesada que tienen la secuencia de aminoácidos expuestas en los residuos 20-138 de SEQ ID NO: 2, los residuos 19-135 de SEQ ID NO: 6, y los residuos 20-141 de SEQ ID NO: 10, respectivamente. Un ácido nucleico que codifica para una región variable de cadena

pesada A1 humanizada comprende los nucleótidos 1-358 de SEQ ID NO: 48. Los ácidos nucleicos que codifican para las regiones variables de cadena ligera A1, A2, y A3 comprende los nucleótidos 61-381 de SEQ ID NO: 3, los nucleótidos 67-390 de SEQ ID NO: 7, y los nucleótidos 61-381 de SEQ ID NO: 11, respectivamente, que codifican para las regiones variables de cadena pesada que tienen las secuencias de aminoácidos expuestas como los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 4, los residuos 23-130 de SEQ ID NO: 8, y los residuos 21-127 de SEQ ID NO: 12, respectivamente. Los ácidos nucleicos adicionales de la invención comprenden nucleótidos que codifican para las regiones variables A1, A2, y A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C.

Los ácidos nucleicos de la invención también pueden comprender una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a cualquiera de SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, y 48, que incluyen secuencias de nucleótidos que son al menos 90 % idénticas a las secuencias codificantes de región variable de cualquiera de SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, y 11, tal como al menos aproximadamente 91 % idénticas o al menos 92 % idénticas, tal como al menos 93 % idénticas, o al menos 94 % idénticas, o al menos 95 % idénticas, o al menos 96 % idénticas, o al menos 97 % idénticas, o al menos 98 % idénticas, o al menos 99 % idénticas. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de la invención pueden comprender (a) una secuencia

de nucleótidos que es al menos 98 % idéntica a la secuencia
codificante de región variable de SEQ ID NO: 1; (b) una
secuencia de nucleótidos que es al menos 97 % idéntica a la
secuencia codificante de región variable de SEQ ID NO: 3; (c)
5 una secuencia de nucleótidos que es al menos 98 % idéntica a
la secuencia codificante de región variable de SEQ ID NO: 5;
(d) una secuencia de nucleótidos que es al menos 98 % idéntica
a la secuencia codificante de región variable de SEQ ID NO: 7;
(e) una secuencia de nucleótidos que es al menos 99 % idéntica
10 a la secuencia codificante de región variable de SEQ ID NO:
11; o (f) una secuencia de nucleótidos que es al menos 89 %
idéntica a la secuencia codificante de región variable de SEQ
ID NO: 48. Las secuencias se comparan para correspondencia
máxima usando un algoritmo de comparación de secuencia que usa
15 la secuencia de codificación de la región variable de longitud
completa de cualquiera de SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 48, o
secuencias de nucleótidos que codifican para las secuencias de
región variable A1, A2, y A3 humanizadas representadas en las
Figuras 9A-9H como la secuencia de búsqueda, como se describe
20 más adelante en la presente, o por inspección visual. Ver
también Ejemplo 1 y Tabla 1, y Ejemplo 7 y Tabla 11.

Las secuencias sustancialmente idénticas pueden ser
secuencias polimórficas, es decir, secuencias o alelos
alternativos en una población. Una diferencia alélica puede
25 ser tan pequeña como un par de bases. Las secuencias

sustancialmente idénticas también pueden comprender secuencias mutagenizadas, incluyendo secuencias que comprenden mutaciones imperceptibles. Una mutación puede comprender uno o más cambios de residuos, una supresión de uno o más residuos, o
5 una inserción de uno o más residuos adicionales.

Los ácidos nucleicos sustancialmente idénticos se identifican adicionalmente como ácidos nucleicos que hibridizan específicamente a o hibridizan sustancialmente a la longitud completa de cualquiera de SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9,
10 11, ó 48; la longitud completa de una secuencia codificante de región variable de cualquiera de SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, ó 48; o secuencias de nucleótidos que codifican para secuencias de región variable A1, A2, y A3 humanizadas, representadas en las Figuras 9A-9H, bajo condiciones severas.
15 En el contexto de hibridación de ácido nucleico, dos secuencias de ácido nucleico que se comparan, se pueden designar 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 prueba, frecuentemente encontrada dentro
20 de una población heterogénea de moléculas de ácido nucleico. Una secuencia objetivo es sinónima con una secuencia de prueba.

Para estudios de hibridación, las sondas útiles son complementarias a o imitan al menos una secuencia de
25 aproximadamente 14 a 40 nucleótidos de una molécula de ácido

nucleico de la presente invención. De manera preferente, las sondas comprenden de 14 a 20 nucleótidos, o aún más largas cuando se desea, tal como 30, 40, 50, 60, 100, 200, 300, ó 500 nucleótidos o hasta la longitud completa de cualquiera de SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, ó 48; la longitud completa de una secuencia codificante de región variable de cualquiera de SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, 11, ó 48; o secuencias de nucleótidos que codifican para secuencias de región variable A1, A2, y A3 humanizadas, representadas en las Figuras 9A-9C. Estos 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 vectores recombinantes para producción recombinante.

La hibridación específica se refiere a la unión, depleción, o hibridación de una molécula sólo a una secuencia particular de los nucleótidos bajo condiciones severas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN celular total). La hibridación específica puede acomodar malas correspondencias entre la sonda y la secuencia objetivo dependiendo de la severidad de las condiciones de hibridación.

Las condiciones de hibridación severas y las condiciones de lavado de hibridación severa en el contexto de los experimentos de hibridación de ácido nucleico tal como

análisis por transferencia Southern y Northern son ambas dependientes de la secuencia en el ambiente. Las secuencias más largas se hibridizan específicamente a mayores temperaturas. Se encuentra una guía extensa a la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I Capítulo 2, Elsevier, New York, New York. En general, se seleccionan condiciones de lavado e hibridación altamente severas para que sean aproximadamente 5°C menor que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una concentración iónica definida y pH definido. Típicamente, bajo condiciones severas, una sonda hibridará específicamente a su subsecuencia objetivo, pero no a otras secuencias.

La T_m es la temperatura (bajo concentración iónica definida y pH definido) a la cual 50 % de la secuencia de la secuencia objetivo hibridiza a una sonda perfectamente correspondida. Se seleccionan condiciones muy severas para que sean igual a la T_m para una sonda particular. Un ejemplo de condiciones de hibridación severa para análisis de transferencia Southern o Northern de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de aproximadamente 100 residuos complementarios es hibridación durante la noche en formamida al 50 % con 1 mg de heparina a 42°C. Un ejemplo de condiciones de lavado altamente severas es 15 minutos en 0.1 X SSC a 65°C.

Un ejemplo de condiciones severas de lavado es 15 minutos en amortiguador 0.2 X SSC a 65°C. Ver Sambrook et al., eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, para una descripción del amortiguador SSC. Frecuentemente, un lavado de alta severidad se precede por un lavado de baja severidad para remover la señal de sonda de fondo. Un ejemplo de condiciones de lavado de severidad media para un dúplex de más de aproximadamente 100 nucleótidos es 15 minutos en 1 X SSC a 45°C. Un ejemplo de lavado de baja severidad para un dúplex de más de aproximadamente 100 nucleótidos es 15 minutos en 4X a 6X SSC a 40°C. Para sondas cortas (por ejemplo, aproximadamente de 10 a 50 nucleótidos), las condiciones severas comprenden típicamente concentraciones de sal de menos de aproximadamente ión de Na⁺ de 1M, típicamente concentración de ión Na⁺ de aproximadamente 0.01 a 1M (u otras sales) a pH 7.0-8.3, y la temperatura es típicamente al menos aproximadamente 30°C. También se pueden lograr condiciones severas con la adición de agentes de desestabilizantes tal como formamida. En general, una relación de señal a ruido de dos veces (o mayor) que aquélla observada para una sonda no relacionada en el ensayo de hibridación particular indica detección de una hibridación específica.

Lo siguiente son ejemplos de condiciones de hibridación y de lavado que se pueden usar para identificar

secuencias de nucleótidos que son sustancialmente idénticas a las secuencias de nucleótidos de referencia de la presente invención: Una secuencia de nucleótidos de sonda hibridiza preferentemente a una secuencia de nucleótidos objetivo en 5 dodecil-sulfato de sodio al 7 % (SDS), NaPO_4 0.5M, EDTA 1mM a 50°C seguido por lavado en 2X SSC, SDS al 0.1 % a 50°C; de manera más preferente, una secuencia de sonda y objetivo hibridiza en dodecil-sulfato de sodio al 7 % (SDS), NaPO_4 0.5M, EDTA 1mM a 50°C seguido por lavado en 1X SSC, SDS al 0.1 10 % a 50°C; de manera más preferente, una secuencia de sonda y objetivo hibridiza en dodecil-sulfato de sodio (SDS) al 7 %, NaPO_4 0.5M, EDTA 1mM a 50°C seguido por lavado en 0.5X SSC, SDS al 0.1 % a 50°C; de manera más preferente, una secuencia de sonda y objetivo hibridiza en dodecil-sulfato de sodio 15 (SDS) al 7 %, NaPO_4 0.5M, EDTA 1mM a 50°C seguido por lavado en 0.1X SSC, SDS al 0.1 % a 50°C; de manera más preferente, una secuencia de sonda y objetivo hibridiza en dodecil-sulfato de sodio al 7 % (SDS), NaPO_4 0.5M, EDTA 1mM a 50°C seguido por lavado en 0.1X SSC, SDS al 0.1 % a 65°C.

20 Una indicación adicional de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las proteínas codificadas por los ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas, comparten una estructura tridimensional completa, o son equivalentes biológicamente 25 funcionales. Estos términos se definen adicionalmente más

adelante en la presente. Las moléculas de ácido nucleico que no hibridizan entre sí bajo condiciones severas aún son sustancialmente idénticas si las proteínas correspondientes son sustancialmente idénticas. Esto puede presentarse, por ejemplo, cuando dos secuencias de nucleótidos comprenden variantes conservadoramente sustituidas como se permita por el código genético.

Las variantes conservadoramente sustituidas son secuencias de ácido nucleico que tienen sustituciones degeneradas de codones en donde la tercera posición de uno o más codones seleccionado (o todos) está sustituida con residuos de base mezclada y/o de desoxiinosina. Ver Batzer et al. (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; y Rossolini et al. (1994) *Mol. Cell Probes* 8:91-98.

Los ácidos nucleicos de la invención también comprenden ácidos nucleicos complementarios a cualquiera de SEQ ID Nos. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 48, o secuencias de nucleótidos que codifican para secuencias de región variable A1, A2, y A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C y subsecuencias y secuencias alargadas de SED ID Nos. 1, 3, 5, 7, 9, 11, 48 o secuencias de nucleótidos que codifican para secuencias de región variable A1, A2 y A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C, y secuencias complementarias de las mismas. Las secuencias complementarias son dos secuencias de nucleótidos

que comprenden secuencias de nucleótidos antiparalelas capaces de apareamiento entre sí en la formación de enlaces de hidrógeno entre pares de bases. Como se usa en la presente, el término secuencias complementarias significa secuencias de
5 nucleótidos que son sustancialmente complementarias, como se puede valorar por los mismo métodos de comparación de nucleótidos expuestos más adelante, o se define como que son capaces de hibridar al segmento de ácido nucleico en cuestión bajo condiciones de relativa severidad tal como aquéllas
10 descritas en la presente. Un ejemplo particular de un segmento de ácido nucleico complementario es un oligonucleótido antisentido.

Una subsecuencia es una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una parte de una secuencia más larga
15 de ácido nucleico. Una subsecuencia de ejemplo es una sonda, descrita anteriormente en la presente, o un cebador. El término cebador como se usa en la presente se refiere a una secuencia contigua que comprende aproximadamente 8 o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, de manera preferente
20 10-20 nucleótidos, y de manera más preferente 20-30 nucleótidos de una molécula seleccionada de ácido nucleico. Los cebadores de la invención abarcan oligonucleótidos de longitud suficiente y secuencia apropiada para proporcionar inicio de polimerización en una molécula de ácido nucleico de
25 la presente invención.

Una secuencia alargada comprende nucleótidos adicionales (u otras moléculas análogas) incorporadas en el ácido nucleico. Por ejemplo, una polimerasa (por ejemplo, una ADN-polimerasa) puede adicionar secuencias en el término 3' de la molécula de ácido nucleico. Además, las secuencias de nucleótidos se puede combinar con otra secuencias de ADN, tal como a promotores, regiones promotoras, intensificadores, señales de poliadenilación, secuencias intrónicas, sitios adicionales de enzimas de restricción, sitios de clonación múltiple, y otros segmentos de codificación. De esta manera, la invención también proporciona vectores que comprenden los ácidos nucleicos descritos, incluyendo vectores para la expresión recombinante, en donde un ácido nucleico de la invención se enlaza operativamente a un promotor funcional. Cuando se enlaza de manera operativa a un ácido nucleico, un promotor está en combinación funcional con el ácido nucleico tal que la transcripción del ácido nucleico se controle y regule por la región promotora. Los vectores se refieren a ácidos nucleicos capaces de replicación en una célula hospedadora, tal como plásmidos, cósmicos y vectores virales.

Los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden clonar, sintetizar, alterar, mutagenizar, o combinaciones de los mismos. En la técnica se conocen técnicas de clonación molecular y de ADN recombinantes, normales, usadas para aislar ácidos nucleicos. La mutagénesis específica

del sitio para crear cambios de pares de base, supresiones, o pequeñas inserciones 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.

II.B Polipéptidos anti-5T4

La presente invención también proporciona polipéptidos anti-5T4 aislados. Los polipéptidos y proteínas se refieren cada uno a un compuesto elaborado de una cadena individual de aminoácidos unidos por enlaces de péptidos. Los polipéptidos de región variable de cadena pesada representativos se exponen como los residuos 20-138 de SEQ ID No. 2, residuos 19-135 del SEQ ID No. 6, residuos 20-141 de SEQ ID No. 10, residuos 1-119 de SEQ ID No. 49. Los polipéptidos de región variable de cadena ligera representativos se exponen como residuos 21-127 de SEQ ID No. 4, residuos 23-130 de SEQ ID No. 8, residuos 21-127 de SEQ ID No. 12. Los polipéptidos adicionales de la invención comprenden aminoácidos de las regiones variables A1, A2 y A3

humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C.

Los polipéptidos adicionales de la invención incluyen polipéptidos de región variable de cadena ligera y cadena pesada que son sustancialmente similares a los

5 polipéptidos anti-5T4 descritos, tal como al menos aproximadamente 90 % idénticos a las regiones variables de SEQ ID No. 2, 4, 6, 8, 10, 12, y 49, por ejemplo, al menos aproximadamente 91 % idénticos, al menos 92 % idénticos, al menos 93 % idénticos, al menos 94 % idénticos, al menos 95 %

10 idénticos, al menos 96 % idénticos, al menos 97 % idénticos, al menos 98 % idénticos, o al menos 99 % idénticos. Las secuencias se comparan para correspondencia máxima usando un algoritmo de comparación de secuencias que usa la secuencia de longitud completa de cualquiera de las SEQ ID Nos. 2, 4, 6, 8,

15 10, 12, 49 o cualquiera de las regiones variables A1, A2 o A3 humanizadas representadas en las Figuras 9A-9C como la secuencia de búsqueda, o la secuencia de región variable de las mismas, o por inspección visual. La invención abarca además polipéptidos codificados con cualquiera de los ácidos

20 nucleicos descritos en la presente.

Por ejemplo, los polipéptidos representativos de la invención incluyen (a) polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % similar a residuos 20-138 de SEQ ID No. 2; (b) polipéptidos que tienen una secuencia de

25 aminoácidos que es al menos 94 % similar a los residuos 21-127

de SEQ ID No. 4; (c) polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 86 % similar a los residuos 19-135 de SEQ ID No. 6; (d) polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % similar a los residuos 23-130 de SEQ ID No. 8; (e) polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % similar a los residuos 20-141 de SEQ ID No. 10; (f) polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % similar a los residuos 21-127 de SEQ ID No. 12; y (g) polipéptidos que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % similar a los residuos 1-119 de SEQ ID No. 49. Ver Ejemplo 1 y Tabla 2, y Ejemplo 7 y Tabla 11.

Los polipéptidos de la invención pueden comprender aminoácidos que se presentan de manera natural, aminoácidos sintéticos, aminoácidos genéticamente codificados, aminoácidos no genéticamente codificados, y combinaciones de los mismos. Los polipéptidos pueden incluir aminoácidos tanto de la forma L como de la forma D.

Los aminoácidos no genéticamente codificados representativos incluyen pero no se limitan a ácido 2-aminoadípico; ácido 3-aminoadípico; ácido β -aminopropiónico; ácido 2-aminobutírico; ácido 4-aminocutírico (ácido piperidínico); ácido 6-aminocaproico; ácido 2-aminoheptanoico; ácido 2-aminoisobutírico; ácidos 3-aminoisobutírico; ácido 2-aminopimélico; ácido 2,4-diaminobutírico; desmosina; ácido

2,2'-diaminopimélico; ácido 2,3-diaminopropionico; N-etilglicina; N-etilasparagina; hidroxilisina; alo-hidroxilisina; 3-hidroxiprolina; 4-hidroxiprolina; isodesmosina; alo-isoleucina; N-metilglicina (sarcosina); N-
5 metilsoleucina; N-metilvalina; norvalina; norleucina; y ornitina.

Los aminoácidos derivatizados representativos incluyen, por ejemplo, aquéllas moléculas en las cuales los grupos amino libres se han derivatizado para formar
10 clorhidratos de amina, grupos p-tolueno-sulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxycarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres se pueden derivatizar para formar sales, ésteres metílicos y etílicos u otros tipos de ésteres o hidracidas. Los grupos hidroxilo
15 libres se pueden derivatizar para formar derivados de O-acilo u O-alquilo. El nitrógeno de imidazol de histidina se puede derivatizar para formar N-im-bencilhistidina.

La presente invención también proporciona fragmentos de un polipéptido anti-5T4 de la invención, por ejemplo,
20 fragmentos que constituyen un sitio de unión a antígenos 5T4. Las secuencias de polipéptido que son más largas que las secuencias descritas también se proporcionan. Por ejemplo, se pueden adicionar uno o más aminoácidos al N-término o C-término de un polipéptido de anticuerpo. Estos aminoácidos
25 adicionales se pueden emplear en una variedad de aplicaciones,

incluyendo pero no limitados a aplicaciones de purificación. En la técnica se conocen métodos para preparar proteínas alargadas.

Los polipéptidos anti-5T4 de la invención incluyen
5 proteínas que comprenden aminoácidos que son variantes conservadoramente sustituidas de cualquiera de SEQ ID Nos. 2, 4, 6, 8, 10, 12 ó 49. Una variante conservadoramente sustituida se refiere a un polipéptido que comprende un aminoácido en el cual se han sustituido de manera conservadora
10 uno o más residuos con un residuo funcionalmente similar.

Los ejemplos y sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo no polar (hidrófobo) tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro; la sustitución de un residuo polar (hidrófilo) por otro tal como
15 entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre glicina y serina; la sustitución de un residuo básico tal como lisina, arginina o histidina por otro; o la sustitución de un residuo ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro.

20 Los polipéptidos aislados de la invención se pueden purificar u caracterizar usando una variedad de técnicas normales que se conocen por el experto en la técnica. Ver, por ejemplo, Schröder & Lübke (1965) The Peptides. Academic Press, New York; Bodanszky (1993) Principles of Peptide Synthesis,
25 2nd rev. ed. Springer-Verlag, Berlin/New York; Ausubel (ed.)

(1995) Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed. Willey, New York.

II.C. Comparaciones de Secuencias de Nucleótidos y
5 Aminoácidos.

Los términos idéntico o por ciento de identidad en el contexto de dos o más secuencias de nucleótidos o proteínas, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje especificado de
10 residuos de aminoácido o nucleótidos que son los mismos, cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima, como se mide usando uno de los algoritmos de comparación de secuencia descritos en la presente o por inspección visual.

El término sustancialmente idéntico con respecto a
15 una secuencia de nucleótidos o de proteínas significa que una secuencia particular varia de la secuencia de una secuencia que se presenta de manera natural por una o más supresiones, sustituciones, o adiciones, el efecto neto de lo cual es retener la función biológica de un ácido nucleico o
20 polipéptido anti-5T4.

Para comparación de dos o más secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia a la cual se comparan una o más secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de
25 secuencia, las secuencias de prueba y de referencia se

introducen en un programa de computadora, se designan las coordenadas de sub-secuencia, si es necesario, y se seleccionan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias entonces
 5 calcula el por ciento de identidad de secuencia para la secuencia de prueba designada con relación a la secuencia de referencia, en base a los parámetros seleccionados del programa.

La alineación óptima de secuencias para comparación
 10 se puede llevar a cabo, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman (1981) *Adv. Appl. Math* 2:482-489, por el algoritmo de alineación por homología de Needleman & Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453, por la búsqueda por el método de similitud de Pearson & Lipman (1988)
 15 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448, por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin), or by visual inspection. See generally, Ausubel (ed.) (1995) Short Protocols in
 20 Molecular Biology, 3rd ed. Wiley, New York.

Un algoritmo preferido para determinar el por ciento de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. El software para realizar análisis de
 25 BLAST está públicamente disponible a través del Centro

Nacional para la Información Biotecnológica
(<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 nucleótidos, los
5 parámetros por defecto de BLASTn se ajustan en W=11 (longitud
de palabra) y E=10 (expectación), y también incluyen el uso de
un filtro de baja complejidad para enmascarar los residuos de
la secuencia de búsqueda que tiene baja complejidad
composicional. Para comparación de dos secuencias de
10 aminoácidos, los parámetros por defecto del programa BLASTp se
ajustan a W=3 (longitud de palabra), E=10 (expectación), el
uso de la matriz de puntuación BLOSUM62, costos de separación
de existencia=11 y extensión=1, y uso de un filtro de baja
complejidad para enmascarar los residuos de la secuencia de
15 búsqueda que tiene baja complejidad composicional. Ver Ejemplo
1.

III. Conjugados de Anticuerpo Anti-5T4/Fármaco.

La presente invención proporciona además conjugados
20 de anticuerpo/fármaco que comprenden un anticuerpo anti-5T4 de
la invención. También se proporcionan métodos para preparar
los conjugados de anticuerpo/fármaco, tal que el fármaco se
una al anticuerpo ya sea de manera directa o indirecta. Los
conjugados de anticuerpo/fármaco de la invención tienen la
25 fórmula general $5T4Ab(-X-W)_m$.

en donde:

5T4Ab es un anticuerpo anti-5T4 o un fragmento de anticuerpo como se describe en la presente;

X es un ligador que comprende un producto de cualquier grupo reactivo que puede reaccionar con un anticuerpo anti-5T4 o fragmento de anticuerpo;

W es un fármaco;

m es la carga promedio para un producto de conjugación purificado (por ejemplo, m tal que el fármaco constituya aproximadamente 3-10 % del conjugado por peso); y

$(-X-W)_m$ es un derivado de fármaco.

También se proporcionan métodos para preparar conjugados de anticuerpo/fármaco de la invención. Como un ejemplo, se puede preparar un conjugado de anticuerpo/fármaco de la fórmula $5T4Ab(-X-W)_m$ al (a) adicionar el derivado de fármaco al anticuerpo anti-5T4 en donde el fármaco es 3-10 % en peso del anticuerpo anti-5T4; (b) incubar el derivado de fármaco y el anticuerpo anti-5T4 en una solución amortiguadora, compatible con la proteína, no nucleófila, que tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 7 a 9 para producir un conjugado de anticuerpo/fármaco, en donde la solución comprende además (i) un cosolvente orgánico adecuado, y (ii) uno o más aditivos que comprenden al menos un ácido biliar o su sal, y en donde la incubación se lleva a cabo a una temperatura que varía desde aproximadamente 30°C a

aproximadamente 35°C durante un periodo de tiempo que varía desde aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 24 horas; y (c) someter el conjugado producido en el paso (b) a un proceso de separación cromatográfica para separar los conjugados de anticuerpo/fármaco con una carga en el intervalo de 3-10 % en peso de fármaco y con una fracción baja conjugada (LCF) del anticuerpo anti-5T4 no conjugado, derivado de fármaco, y conjugados agregados.

10 III.A. Fármacos

Un fármaco es cualquier sustancia que tenga actividad biológica o detectable, por ejemplo, agentes terapéuticos, marcas detectables, agentes de unión, etc., y profármacos, que se metabolizan a un agente activo *in vivo*. Un fármaco también puede ser un derivado de fármaco, en donde se ha funcionalizado un fármaco para permitir la conjugación con un anticuerpo de la invención. En general, estos tipos de conjugados se refieren como inmunoconjugados.

Los agentes terapéuticos son composiciones que se pueden usar para tratar o prevenir una condición en un sujeto en necesidad de las mismas. Los agentes terapéuticos útiles en la invención incluyen agentes anticancerígenos, es decir, agentes que tienen actividad anti-cáncer en células que expresan 5T4 tal como células cancerígenas de carcinoma pulmonar escamoso/adenomatoso (carcinoma pulmonar de células

no pequeñas), carcinoma invasivo de mama, carcinoma colorectal, carcinoma gástrico, carcinoma cervical escamoso, adenocarcinoma endometrial invasivo, carcinoma invasivo de páncreas, carcinoma ovárico, carcinoma vesical escamoso y
5 coriocarcinoma.

Los fármacos terapéuticos representativos incluyen citotoxina, radioisótopos, agentes quicioterapéuticos, agentes inmunomoduladores, agentes anti-angiogénicos, agentes anti-proliferativos, agentes pro-apoptóticos, y agentes
10 citostáticos y citolíticos (por ejemplo, ARNsas). Un fármaco también puede incluir un ácido nucleico terapéutico, tal como un gen que codifica para un agente inmunomodulador, un agente anti-angiogénico, un agente anti-proliferativo, un agente pro-apoptótico. Estas descripciones de fármaco no son mutuamente
15 exclusiva, y de esta manera se puede describir un agente terapéutico usando uno o más de los términos señalados anteriormente. Por ejemplo, los radioisótopos seleccionados también son citosina. Los agentes terapéuticos se pueden preparar como sales, ácidos farmacéuticamente aceptables o
20 derivados de cualquiera de los anteriores. En general, los conjugados que tienen un radioisótopo tal como el fármaco se refieren como radioinmunoconjugados y aquéllos que tienen un agente quimioterapéutico como el fármaco se refieren como quimioinmunoconjugados.

25 Los ejemplos de fármacos adecuados para el uso en

inmunoconjugados incluyen los taxanos, maytansinas, CC-1065 y duocarmicinas, las caliqueamicinas y otras enediynas, y las auristatinas. Otros ejemplos incluyen los anti-foliatos, alcaloides de vinca pervinca, y las antraciclinas. También se
5 pueden usar en los inmunoconjugados toxinas vegetales, otras proteínas bioactivas, enzimas (es decir, ADEPT), radioisótopos, fotosensibilizadores (es decir, para terapia fotodinámica). Además, se pueden elaborar conjugados usando portadores secundarios como el agente citotóxico, tal como
10 liposomas o polímeros, a manera de ejemplo.

El término citotoxina se refiere en general a un agente que inhibe o previene la función de células y/o da por resultado destrucción de las células. Las citotoxinas representativas incluyen antibióticos, inhibidores de
15 polimerización de tubulina, agentes de alquilación que se unen e interrumpen el ADN, y agentes que interrumpen la síntesis de proteínas o la función de proteínas celulares esenciales tal como proteína-quinasas, fosfatasas, topoisomerasas, enzimas y ciclinas. Las citotoxinas representativas incluyen, pero no se
20 limitan a, doxorubicina, daunorubicina, idarubicina, aclarubicina, zorubicina, mitoxantrona, epirubicina, carubicina, nogalamicina, menogaril, pitarubicina, valrubicina, citarabina, gemcitabina, trifluridina, ancitabina, enocitabina, azacitidina, doxifluridina,
25 pentostatina, broxuridina, capecitabina, cladribina,

decitabina, floxuridina, fludarabina, gougerotina, puromicina, tegafur, tiazofurina, adriamicina, cisplatina, carboplatina, ciclofosfamida, dacarbazina, vinblastina, vincristina, mitoxantrona, bleomicina, mecloretamina, prednisona, 5 procarbazona, metotrexato, flurouracilos, etoposido, taxol, análogos de taxol, platina tal como cis-platina y carboplatina, mitomicina, tiotepa, taxanos, vincristina, daunorubicina, epirubicina, actinomicina, autramicina, azaserinas, bleomicinas, tamoxifeno, idarubicina, 10 dolastatinas/auristatinas, hemiasterlinas, esperamicinas y maitansinoides.

En modalidades particulares de la invención, una citotoxina es un antibiótico tal como una caliqueamicina, también llamada el complejo LL-E33288, por ejemplo, gamma- 15 caliqueamicina (?₁) o N-acetil-gamma-caliqueamicina. Ver Patente de los Estados Unidos Número 4,970,198. Los ejemplos adicionales de caliqueamicina adecuados para el uso en la preparación de conjugados de anticuerpo/fármaco de la invención se describe en las Patentes de los Estados Unidos 20 Números 4,671,958; 5,053,394; 5,037,651; 5,079,233; y 5,108,912, que se incorporan en la presente en su totalidad. Estos compuestos contienen un metiltrisulfuro que se puede seleccionar con tioles apropiados para formar disulfuros, al mismo tiempo que introduce un grupo funcional tal como una 25 hidracida u otro grupo funcional que es útil para conjugar

caliqueamicina a un anticuerpo anti-5T4. Los análogos de disulfuro de caliqueamicina también se pueden usar, por ejemplo, los análogos descritos en las Patentes de los Estados Unidos Números 5,606,040 y 5,770,710, que se incorporan en la presente en su totalidad.

Para aplicaciones de radioterapia, un anticuerpo anti-5T4 de la invención puede comprender un radioisótopo de alta energía. El isótopo se puede unir directamente al anticuerpo, por ejemplo, a un residuo de cisteína presente en el anticuerpo, o un quelador se puede usar para mediar la unión del anticuerpo y el radioisótopo. Los radioisótopos adecuados para radioterapia incluyen pero no se limitan a a-emisores, β -emisores, y electrones de barrena. Para aplicaciones de diagnóstico, los radioisótopos útiles incluyen emisores de positrones y γ -emisores. Un anticuerpo anti-5T4 de la invención se puede yodar adicionalmente, por ejemplo, en un residuo de tirosina del anticuerpo, para facilitar la detección o efecto terapéutico del anticuerpo. Los radioisótopos representativos que se pueden conjugar a un anticuerpo anti-5T4 incluyen ^{18}F fluor, ^{64}Cu cobre, ^{65}Cu cobre, ^{67}Ga galio, ^{68}Ga galio, ^{77}Br bromo, $^{88\text{m}}\text{Br}$ bromo, ^{95}Ru rutenio, ^{97}Ru rutenio, ^{103}Ru rutenio, ^{105}Ru rutenio, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tecnecio, ^{107}Hg mercurio, ^{203}Hg mercurio, ^{123}I yodo, ^{124}I yodo, ^{125}I yodo, ^{126}I yodo, ^{131}I yodo, ^{133}I yodo, ^{111}In indio, ^{113}In indio, $^{99\text{m}}\text{In}$ renio, ^{105}In renio, ^{101}In renio, ^{186}Re renio, ^{188}Re renio, $^{121\text{m}}\text{Te}$ telurio, ^{99}Tc tecnecio, $^{122\text{m}}\text{Te}$ telurio, $^{125\text{m}}\text{Te}$ telurio, ^{165}Tl tulio, ^{167}Tl tulio, ^{168}Tl tulio, ^{90}Y itrio, y

formas de nitruro u óxido de los mismos. Otros radioisótopos adecuados se incluyen alfa-emisores, tal como ²¹³bismuto, ²¹³plomo y ²²⁵actinio.

Los conjugados de anticuerpo/fármaco de la invención
5 pueden incluir inmunomoduladores, es decir, agentes que producen una respuesta inmunitaria, incluyendo respuestas inmunitarias humorales (por ejemplo la producción de anticuerpos específicos a antígenos) y respuestas inmunitarias mediadas por células (por ejemplo, proliferación de
10 linfocitos). Los agentes inmunomoduladores representativos incluyen citosinas, xantinas, interlucinas, interferones, y factores de crecimiento (por ejemplo TNF, CSF, GM-CSF y G-CSF), y hormonas tal como estrógenos (dietilestilbrestol, estraiol), andrógenos (testosterona, HALOTESTIN^{MR}
15 (fluoximesterona)), progestinas (MEGACE^{MR} (acetato de meggestrol), PROVERA^{MR} (acetato de medroxiprogesterona)), y corticosteorides (prednisona, dexametasona, hidrocortisona).

Los agente inmunomoduladores útiles en la invención también incluyen anti-hormonas que bloquean la acción hormonal
20 en tumores y agentes inmunosupresores que suprimen la producción de citosinas, reducen la expresión de auto-antígenos, o enmascaran los antígenos de MHC. Las anti-hormonas representativas incluyen anti-estrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles
25 que inhiben aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno,

keoxifeno, LY 117018, onapnston, y toremifeno; y anti-andrógenos tal como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y agentes anti-adrenales. Los agentes inmunosupresores representativos incluyen piridina 2-amino-6-aril-5-sustituídas, azatioprina, ciclofosfamida, bromocriptina, danazol, dapsona, glutaraldehído, anticuerpos anti-idiotípicos para antígenos de MHC y fragmentos de MHC, ciclosporina A, esteroides tal como glucocorticosteorides, citosina o antagonistas de receptor de citosina (por ejemplo, anticuerpo anti-interferón, anticuerpos anti-IL10, anticuerpos anti-TNFa, anticuerpos anti-IL2), estreptocinasa, TGFβ, rapamicina, receptor de células T, fragmentos de receptos de células T, y anticuerpos de receptor de células T.

Los fármacos adicionales útiles en la invención incluyen agentes anti-angiogénicos que inhiben la formación de vasos sanguíneos, por ejemplo, inhibidores de farmesiltransferasa, inhibidores de COX-2, inhibidores de VEGF, inhibidores de bFGF, inhibidores de sulfatasa esteroide, (por ejemplo, bis-sulfamato de 2-metoxioestradiol (2-MeOE2bismATE)), interleucina-24, trombospondina, proteínas de metalospondina, interferones clase I, interleucina 12, protamina, angiostatina, laminina, endostatina y fragmentos de prolactina.

Los agentes anti-proliferativos de agentes pro-apoptóticos incluyen activadores de PPAR-gamma (por ejemplo,

prostaglandinas de ciclopentenona (cyPG)), retinoides, triterpinoides (por ejemplo, cicloartano, lupano, ursano, oleanano, friedelano, dammarano, cucurbitacina, y triterpenoides limonoides), inhibidores del receptor de EGF (por ejemplo, HER4), rampamicina, CALCITRIOL^{MR} (1,25-dihidroxicolecalciferol (vitamina D)), inhibidores de aromatasa (FEMARA^{MR} (tetrozona)), inhibidores de telomerasa, queladores de hierro, (por ejemplo, 3-aminopiridina-2-carboxaldehído-tiosemicarbazona (Triapina)), apoptina (proteína viral 3 - VP3 de virus de anemia de pollo), inhibidores de Bcl-2 y Bcl-X(L), TNF-alfa, ligando de FAS, ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL/Apo2L), y activadores de la señalización de TNF-alfa/ligando de FAS/ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL/Apo2L), e inhibidores de la señalización de la ruta de supervivencia de PI3K-Akt (por ejemplo, UCN-01 y geldanamicina).

Los agentes quimioterapéuticos representativos incluyen agentes de alquilación tal como tiotepa y ciclosfosfamida; sulfonatos de alquilo tal como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziidinas tal como benzodopa, carbocadona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tal como

clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina,
ifosfamida, mequioretamina, clorhidrato de óxido de
mequioretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina,
prednimustina, trofosfarnida, mostaza de uracilo; nitrosureas
5 tal como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina,
nimustina, ranimustina; antibióticos tal como aclacinomisinas,
actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas,
cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina,
carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina,
10 detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina,
epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcellomicina,
mitomicinas, ácido micofenólico nogalamicina, olivomicinas,
peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina,
rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina,
15 ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tal como
metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico
tal como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato;
análogos de purina tal como fludarabina, 6-mercaptopurina,
tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tal como
20 ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina,
didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-
EU; andrógenos tal como calusterona, propionato de
dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona;
anti-suprarenal tal como aminoglutetimida, mitotano,
25 trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido

frolínico; aceglatona; aldofosfarnida-glicósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamida; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglucido; nitrato de galio; 5 hidroxiurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico, 2-etilhidracida; procarbazona; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2'-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; 10 mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosido (Ara-C); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL^{MR}, Bristol-Myers Squibb Oncology de Princeton, New Jersey) y doxetaxel (TAXOTERE^{MR}, Rhone-Poulenc Rorer de Antony, Francia); 15 quiorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tal como cisplatina y carboplatina; vinblastina; platino; etoposido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina, vinorelbina; navelbina; novantrona; teniposido; daunomicina; 20 aininopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; y capecitabina.

Los agentes terapéuticos adicionales que se pueden conjugar a los anticuerpos anti-5T4 y está de acuerdo con los 25 métodos terapéuticos de la presente invención incluyen agentes

fotosensibilizadores (Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2002/0197262 y la Patente de los Estados Unidos No. 5,952,329) para terapia fotodinámica, partículas magnéticas para termoterapia (Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2003/0032995); agente de unión tal como péptidos, ligandos, ligandos de adhesión celular, etc., y profármacos tal como profármacos que contienen fosfato, profármacos que contiene tiofosfato, profármacos que contiene sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos que contienen β -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida sustituida o profármacos que contienen fenilacetamidas sustituida, profármacos de 5-fluorocitocina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir al fármaco libre citotóxico más activo.

Para métodos de diagnóstico usando los anticuerpos anti-5T4, un fármaco puede comprende una marca detectable usado para detectar la presencia de células que expresan 5T4 *in vitro* o *in vivo*. Los radioisótopos que son detectables *in vivo*, tal como aquellas marcas que son detectables usando escintigrafía, formación de imágenes por resonancia magnética, o ultrasonido, se pueden usar en aplicaciones de diagnóstico clínico. Las marcas escintigráficas útiles incluyen emisores de positrones y γ -emisores. Los agentes de contraste representativos para formación de imágenes de fuentes

magnéticas son iones paramagnéticos o superparamagnéticos (por ejemplo, hierro, cobre, manganeso, cromo, erbio, europio, disprosio, holmio y gadolinio), partículas de óxido de hierro, y agentes de contraste solubles en agua. Para detección
5 ultrasónica, se pueden atrapar gases o líquidos en partículas inorgánicas porosas que se liberan como agentes de contraste de microburbujas. Para detección *in vitro*, las marcas detectables útiles incluyen. fluoróforos, epítomos detectables o agentes de unión, y marcas radioactivas.

10

III.B. Moléculas Ligadoras

Los fármacos se conjugan a anticuerpos anti-5T4 quiméricos y humanizados de la invención ya sea directamente o de manera indirecta mediante una molécula ligadora. La
15 molécula ligadora puede ser estable o hidrolizable, por lo que se libera después de la entrada celular. Los mecanismos principales por los cuales se escinde el fármaco del anticuerpo incluyen hidrólisis en el pH ácido de las lisosomas (hidrazonas, acetales y amidas tipo cis-aconitato), la
20 escisión peptídica por enzimas lisosomales (la catepsinas y otras enzimas lisosomales), y reducción de disulfuros. Como resultado de estos mecanismos variables para escisión, los mecanismos de enlace del fármaco al anticuerpo también varían ampliamente y se puede usar cualquier ligador adecuado. De
25 manera preferente, el método de conjugación produce una

muestra con una fracción conjugada mínima baja (LCF, la fracción del anticuerpo principalmente no conjugado), es decir, menos de aproximadamente 10 %.

Un ejemplo de un procedimiento adecuado de conjugación depende de la conjugación de hidrazidas y otros nucleófilos a los aldehídos generados por oxidación de los carbohidratos que se presentan de manera natural en los anticuerpos. Los conjugados que contienen hidrazona se pueden elaborar con grupos carbonilo introducidos que proporcionan las propiedades deseadas de liberación de fármaco. Los conjugados también se pueden elaborar con un ligador que tiene un disulfuro en un extremo, una cadena de alquilo en la parte intermedia, de un derivado de hidrazina en el otro extremo. Las antraciclinas son un ejemplo de citotoxinas que se pueden conjugar a anticuerpos usando esta tecnología.

Los ligadores que contienen grupos funcionales diferentes de hidrazonas tienen el potencial de ser escindidos en el ambiente ácido de las lisosomas. Por ejemplo, se pueden elaborar conjugados a partir de ligadores reactivos a tioles que contienen un sitio diferente de una hidrazona que es escindible intracelularmente, tal como esteres, amidas y acetales/cetales. La camptotecina es un agente citotóxico que se puede conjugar usando estos ligadores. Los cetales elaborados de una cetona de anillo de 5 a 7 miembros, y que tiene uno de los oxígenos unidos al agente citotóxico y el

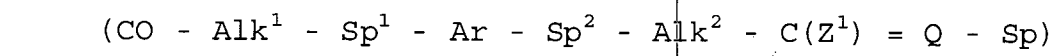
otro a un ligador para la unión al anticuerpo también se pueden usar. Las antraciclinas también son un ejemplo de una citotoxina adecuada para el uso con estos ligadores.

Otro ejemplo de una clase de ligadores sensibles a pH son los cis-acnitatos, que tienen un ácido carboxílico yuxtapuesto a un enlace de amida. El ácido carboxílico acelera la hidrólisis de la amida en las lisosomas ácidas. Los ligadores que logran un tipo similar de aceleración de velocidad de hidrólisis con otros varios tipos de estructuras también se pueden usar. Los maytansinoides son un ejemplo de una citotoxina que se puede conjugar con ligadores unidos en C-9.

Otro método de liberación potencial para conjugados de fármacos es la hidrólisis enzimática de péptidos o las enzimas lisosomales. En un ejemplo, se une un péptido mediante un enlace de amida a alcohol para -aminobencílico y luego se elabora un carbamato o carbonato entre el alcohol bencílico y el agente citotóxico. La escisión del péptido conduce al colapso, o auto-inmolación, del carbamato o carbonato de aminobencilo. Los agentes citotóxicos ejemplificados con esta estrategia incluyen antraciclinas, taxanos, mitomicinas C y auristatinas. En un ejemplo, también se puede liberar un fenol por colapso de ligador en lugar del carbamato. En otra variación, se usa reducción de disulfuro para iniciar el colapso de un carbamato o carbonato de para-mercaptobencilo.

Muchos de los agentes citotóxicos conjugados a los anticuerpos tienen poca, si la hay, solubilidad en agua y que puede limitar la carga del fármaco en el conjugado debido a la agregación del conjugado. Un planteamiento para superar esto es adicionar grupos solubilizadores al ligador. Los conjugados hechos con un ligador que consiste de PEG y un dipéptido se pueden usar, incluyendo aquellos que tienen un di-ácido de PEG, tiol-ácido o maleimida-ácido unido al anticuerpo, un separador dipeptídico, y un enlace de amida a la amina de una antraciclina o un análogo de duocarmicina. Otro ejemplo es un conjugado preparado con un disulfuro ligador que contiene PEG unido a un agente citotóxico y la amida unida a un anticuerpo. Los planteamientos que incorporan grupos PEG pueden ser benéficos al superar la agregación y limitan la carga del fármaco.

Los ligadores representativos preferidos para la preparación de conjugado de anticuerpo/fármaco de la invención incluyen ligadores de la fórmula:



en donde

Alk¹ y Alk² son independientemente una cadena de (C₁-C₁₀) alquileo, unida o ramificada o no ramificada;

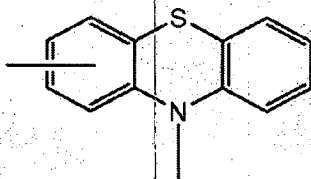
Sp¹ es un enlace, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, -NR'-, -N(CH₂CH₂)₂N-, ó -X-Ar'-Y-(CH₂)_n-Z en donde X, Y e Z son independientemente un enlace, -NR'-, -S- ó -O-, con la

condición que cuando $n=0$, entonces al menos uno de Y e Z debe ser un enlace y Ar' es 1,2-, 1,3-, ó 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de (C_1-C_5) alquilo, (C_1-C_4) alcoxi, (C_1-C_4) tioalcoxi, halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', $-(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, ó $-S(CH_2)_nCONHR'$, con la condición que cuando Alk^1 es un enlace, Sp^1 es un enlace;

n es un número entero de 0 a 5;

R' es una cadena de (C_1-C_5) ramificada o no ramificada opcionalmente sustituida por uno o dos grupos de -OH, (C_1-C_4) alcoxi, (C_1-C_4) tioalcoxi, halógeno, nitro, (C_1-C_3) dialquilamino, o (C_1-C_3) trialquilamonio, $-A^-$, donde A^- es un anión farmacéuticamente estable que completa una sal;

Ar es 1,2-, 1,3-, ó 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de (C_1-C_6) alquilo, (C_1-C_5) alcoxi, (C_1-C_4) tioalcoxi, halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$ en donde n y R' son como se definen anteriormente en la presente o un 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6-, ó 2,7-naftilideno o



con cada naftilideno o fenotiazina opcionalmente sustituida

con uno, dos, tres o cuatro grupos de (C_1-C_6 alquilo, (C_1-C_5) alcoxi, (C_1-C_4 tioalcoxi, halógeno, nitro, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, ó $-S(CH_2)_nCONHR'$, donde n y R' son como se definen anteriormente, con la condición que cuando Ar es fenotiazina, Sp^1 es un enlace únicamente conectado a nitrógeno;

Sp^2 es un enlace, $-S-$, ó $-O-$, con la condición que cuando Alk^2 es un enlace, Sp^2 es un enlace;

Z^1 es H, (C_1-C_5) alquilo, o fenilo opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de (C_1-C_5) alquilo, (C_1-C_5) alcoxi, (C_1-C_4) tioalcoxi, halógeno, nitro, $-COOR'$, $-ONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$, o $-S(CH_2)_nCONHR'$ en donde n y R' son como se definen anteriormente;

Sp es un radical de (C_1-C_{18}) divalente o trivalente, de cadena recta o ramificada, a radical arilo o heteroarilo divalente o trivalente, radical (C_3-C_{18}) cicloalquilo o heterocicloalquilo divalente o trivalente, radical aril- o heteroaril-arilo (C_1-C_{18}) divalente o trivalente, radical cicloalquil- o heterocicloalquil-alquilo (C_1-C_{18}) divalente o trivalente o radical (C_2-C_{18}) alquilo insaturado divalente o trivalente en donde heteroarilo es preferentemente furilo, tienilo, N-metilpirrolilo, piridinilo, N-metilimidazol, oxazolilo, pirimidinilo, quinolilo, isoquinolilo, N-metilcarbazoilo, aminocourmarinilo o fenazinilo y en donde si Sp es un radical trivalente, Sp puede estar opcionalmente

sustituido por grupos (C₁-C₅) dialquilamino inferior (C₁-C₅) alcoxí inferior, hidroxí o (C₁-C₅) alquiltio inferior; y

Q es NHNCO-, =NHNCS-, =NHNCONH-, =NHNCSNH- o =NHO-.

De manera preferente, Alk¹ es una cadena de (C₁-C₁₀) alquilenos ramificada o no ramificada; Sp' es un enlace, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, ó -NR' en donde R' es como se define anteriormente en la presente, con la condición que cuando Alk¹ es un enlace, Sp¹ es un enlace;

Ar es 1,2-, 1,3-, ó 1,4-fenileno opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de (C₁-C₆) alquilo, (C₁-C₅) alcoxí, (C₁-C₄) tioalcoxí, halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR', o -S(CH₂)_nCONHR' en donde n y R' son como se definen anteriormente en la presente, y 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 (C₁-C₆) alquilo, (C₁-C₅) alcoxí, (C₁-C₄) tioalcoxí, halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR' ó -S(CH₂)_nCONHR',

Z¹ es (C₁-C₅) alquilo, o fenilo opcionalmente sustituido con uno, dos o tres grupos de (C₁-C₅) alquilo, (C₁-C₄) alcoxí, (C₁-C₄) tioalcoxí, halógeno, nitro, -COOR', -CONHR', -(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR' ó -S(CH₂)_nCONHR'; Alk² y Sp² son conjuntamente un enlace; y Sp y Q son como se definen inmediatamente antes.

La patente de los Estados Unidos No. 5,773,001 incorporada en la presente en su totalidad, describe ligadores que se pueden usar con fármacos nucleófilos, particularmente hidrazidas y nucleófilos relacionados, preparados a partir de las caliqueamicinas. Estos ligadores son especialmente útiles en aquellas áreas donde se obtiene mejor actividad cuando el enlace formado entre el fármaco y el ligador es hidrolizable. Estos ligadores pueden comprender dos grupos funcionales, que incluyen (1) un grupo para la reacción con un anticuerpo (por ejemplo, ácido carboxílico), y (2) un grupo carbonilo (por ejemplo un aldehído o una cetona) para reacción con un fármaco. Los grupos carbonilo pueden reaccionar con un grupo hidrazida en el fármaco para formar un enlace de hidrazona. Este enlace es hidrolizable, permitiendo la liberación del agente terapéutico del conjugado después de la unión a las células objetivo.

Como un ejemplo, se puede conjugar un anticuerpo anti-5T4 a un fármaco citotóxico al (1) adicionar el derivado de fármaco citotóxico al anticuerpo anti-5T4 en donde el fármaco citotóxico es 4.5 %-11 % en peso del portador proteinaseo; (2) incubar el derivado de fármaco citotóxico y el anticuerpo anti-5T4 en una solución amortiguada compatible con proteína no nucleófila que tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 7 a 9 para producir un conjugado de fármaco/anticuerpo, citotóxico, monomérico, en donde la

solución comprende además (a) un co-solvente orgánico adecuado, y (b) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico de C_6-C_{18} o su sal, y en donde la incubación se lleva a cabo a una temperatura que varía de aproximadamente 5 30°C a aproximadamente 35°C durante un periodo de tiempo que varía de aproximadamente 15 minutos a 24 horas, y (3) someter el conjugado producido en el paso (2) a un proceso de separación cromatográfica para separar conjugados monoméricos con una carga en el intervalo de 3 % a 10 % en peso de fármaco 10 citotóxico con una baja fracción conjugada (LCF) por abajo de 10 % a partir del anticuerpo no conjugado, derivado de fármaco citotóxico, y conjugados agregados.

La separación cromatográfica del paso (3) puede incluir procesos tal como cromatografía de exclusión de tamaño 15 (SEC), ultrafiltración/diafiltración, CLAR, FPLC, o cromatografía con Sephacryl S-200. La separación cromatográfica también se puede lograr por cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando un medio cromatográfico de flujo rápido de Fenil-Sefarosa 6, medio cromatográfico de 20 Flujo Rápido de Butil-Sefarosa 4, medio cromatográfico de Flujo Rápido de Octil-Sefarosa 4, medio cromatográfico Toyopearl Ether-650M medio metil HIC Macro-Prep o medio Macro-Prep t-Butil HIC.

Los métodos representativos para preparar conjugados 25 de anticuerpo anti-5T4/fármaco incluyen a aquellos descritos

para la preparación de CMC-544 en la publicación de solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 2004-082764A1 publicada, co-pendiente y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos 10/699,874, que se incorpora en la presente en su totalidad.

- 5 La conjugación se puede realizar usando las siguientes condiciones: 10 mg/ml de anticuerpo, 8.5 % (p/p) del derivado de caliqueamicina, decanoato de sodio 37.5 mM, etanol al 9 % (v/v), HEPES 50 mM (ácido N-(2-Hidroxietil)piperacina-2'-(4-butanosulfónico)); pH 8.5, 32°C, 1 hora. Se puede realizar
- 10 cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando una resina de butil-sefarosa FF, amortiguador de carga de fosfato de potasio al 0.65 M, amortiguador de lavado de fosfato de potasio (0.49 mM, y amortiguador de elusión de fosfato de potasio 4 mM. Se puede lograr intercambio de amortiguador por
- 15 cromatografía de exclusión de tamaño, ultrafiltraciones/diafiltración, u otros medios adecuados. El conjugado de anticuerpo/fármaco se puede formular en 1.5 % de dextrano-40, 0.9 % de sacarosa, 0.01 de TWEEN^{MR}-80, Tris 20 mM/NaCl 50 mM, pH 8.0. También se puede usar una solución de
- 20 formulación alternativa que contiene 5 % de sacarosa, 0.01 % de TWEEN^{MR}-80, Tris 20 mM/NaCl 10 mM, pH 8.0. Los ciclos de liofilización se ajustan en base a la formulación. La concentración del volumen formulado puede ser 0.5 mg de conjugado/mL. Cada frasco puede contener 1 mg de conjugado, es
- 25 decir, relleno de 2 ml. Se pueden preparar otros volúmenes de

relleno como se desee, por ejemplo, relleno de 5 ml.

Otros métodos representativos incluyen aquellos descritos para CMD-193, también descrito en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 20060002942. Se puede realizar la conjugación usando las siguientes condiciones: 10 mg/ml de anticuerpo, derivado de caliqueamicina al 7 % (p/p), desoxicolato 10 mM, HEPBS 50 mM (ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(4-butanosulfónico)), 9 % (v/v) de etanol, pH 8.2, 32°C, 1 hora. La reacción se puede diluir 10 veces con fosfato de potasio 0.66 M, pH 8.56, y se puede realizar HIC usando resina de butil-sefarosa FF, amortiguador de carga de fosfato de potasio 0.60 M y amortiguador de lavado, y amortiguador de elusión de Tris 20 mM/NaCl 25 mM. Se puede lograr el intercambio de amortiguación usando ultrafiltración/diafiltración con una membrana regenerada de celulosa. El conjugado se puede diafiltrar contra Tris 20 mM/NaCl 10 mM, pH 8.0 (10 diavolumenes). El conjugado de anticuerpo/fármaco se puede formular en 5 % de sacarosa, 0.01 % de TWEEN^{MR}-80, Tris 20 mM/NaCl 10 mM, pH 8.0. La concentración del conjugado en volumen después de la formulación puede ser 1 mg/ml y el relleno del frasco puede ser 5 mg/frasco, es decir, relleno de 5 ml, y se pueden preparar otros volúmenes de relleno como se desee.

En una modalidad particular de la invención, el ligador empleado es ácido 4-(4-acetilfenoxi)butanoico (AcBut).

Se preparan conjugados de anticuerpo/fármaco al hacer reaccionar β -caliqueamicina, γ -caliqueamicina ó N-acetil- γ -caliqueamicina, o derivados de los mismos, con 3-mercapto-3-metil-butanoil-hidrazida, el ligador AcBut, y un anticuerpo anti-5T4 de la invención. Ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos No. 5,773,001. Este ligador produce conjugados que son sustancialmente estables en circulación, liberando un estimado de 2 % del NaC-gamma-DMH por día, y que libera el NAc-gamma-DMH fácilmente en los lisosomas ácidos. En otras modalidades de la invención, se preparan conjugados de anticuerpo/forma cruzando ácido 3-acetilfenil ácido (AcPac) o ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico (Amida) como la molécula ligadora.

Los ligadores representativos útiles para conjugación de radioisótopos incluyen pentaacetato de dietilentriamina (DTPA)-isotiocianato, clorhidrato de nicotinato de succinimidil-6-hidrazinio (SHNH), y hexametilpropileno-amina-oxima (HMPAO) (Bakker et al. (1990) *J. Nucl. Med.* 31:1501-1509, Chattopadhyay et al. (2001) *Nucl. Med. Biol.* 28: 741-744, Dewanjee et al. (1994) *J. Nucl. Med.* 35: 1054-63, Krenning et al. (1989) *Lancet* 1: 242-244, Sagiuchi et al (2001) *Ann. Nucl. Med.* 15:267-270). Patente de los Estados Unidos No. 6,024,938). De manera alternativa, se puede derivatizar una molécula de dirección a objetivo de modo que un radioisótopo se puede unir directamente a esta (Yoo et

al. (1997) *J. Nucl. Med.* 38; 294-300). También se conocen en la técnica métodos de yodinación, 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.

Para incrementar adicionalmente el número de moléculas de fármaco por conjugado de anticuerpo/fármaco, el fármaco se puede conjugar a polietilenglicol (PEG), incluyendo polímeros y monómeros de polietilenglicol rectos o ramificados. Un monómero de PEG es de la fórmula: $-(CH_2CH_2O)-$. Los fármacos y/o análogos peptídicos se pueden unir directamente o indirectamente al PEG, es decir, a través de grupos separadores apropiados tal como azúcares. Una composición de PEG/anticuerpo/fármaco también puede incluir porciones lipófilas y/o hidrófilas adicionales para facilitar la estabilidad del fármaco y la distribución a un sitio objetivo *in vivo*. Los métodos representativos para preparar composiciones que contienen PEG se pueden encontrar en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,461,603; 6,309,633; y 5,648,095, entre otros lugares.

Por ejemplo, para incrementar la cantidad de caliqueamicina en conjugados de anticuerpo-caliqueamicina, el anticuerpo se conjuga a PEG antes de la conjugación con caliqueamicina, por ejemplo, usando PEG-SPA, PEG-SBA, ó PEG-bis-maleimida. Los conjugados de anticuerpo/fármaco preparados

usando PEG pueden mostrar afinidad de unión reducida para el antígeno objetivo, pero aún son efectivos como resultado de carga incrementada de fármaco. Se pueden usar aditivo tal como desoxicolato y decanoato para producir conjugados de anticuerpo/caliqueamicina con bajos niveles de anticuerpo no conjugado y bajos niveles de agregado.

La naturaleza hidrófoba de muchos fármacos, incluyendo las caliqueamicinas, puede dar por resultado la agregación de los conjugados de anticuerpo/fármaco. Para producir conjugados monoméricos de anticuerpo/fármaco con mayor carga/rendimiento de fármaco y agregación disminuida, la reacción de conjugación se puede realizar en una solución amortiguada, compatible con proteína, no nucleófila que contiene (i) propilenglicol como un cosolvente y (ii) un aditivo que comprende al menos un ácido carboxílico de C₆-C₁₈. Los ácidos útiles incluyen ácidos de C₇ a C₁₂ tal como ácido octanóico o ácido caprílico, o sus sales. También se pueden usar otros cosolventes orgánicos compatibles con proteína diferentes de propilenglicol, tal como etilenglicol, etanol, DMF, DMSO, etc. Se usa algo o todo el cosolvente orgánico para transferir el fármaco en la mezcla de conjugación. Los amortiguadores útiles para la preparación de conjugados de anticuerpo/fármaco usando ésteres N-hidroxisuccinimida (OSu) u otros ésteres comparablemente activados incluyen solución salina amortiguada con fosfato (PBS) y ácido N-2-hidroxietil-

piperazina-N'-2-etanosulfónico (amortiguador HEPES). La solución amortiguada usada en reacciones de conjugación debe carecer sustancialmente de aminas y nucleófilos libres. Como otro planteamiento, las reacciones de conjugación se pueden
5 realizar en una solución amortiguada, compatible con proteína, no nucleófila que contiene t-butanol sin los aditivos adicionales. Ver, por ejemplo, patente de los Estados Unidos números 5,712,374 y 5,714,586. En las patentes de los Estados Unidos números 5,739,116 y 5,877,296 se describen métodos
10 adicionales para conjugación y conjugados que contienen caliqueamicina.

Otras condiciones de reacción para la formación de un conjugado monomérico se pueden determinar de manera empírica por variación de variables de reacción tal como
15 temperatura, pH, entrada de derivado de caliqueamicina, y concentración de aditivo. Las concentraciones representativas de propilenglicol varían de 10% a 60%, por ejemplo de 10% a 40%, o aproximadamente 30% en volumen de la solución total. Las cantidades representativas de un aditivo que comprende al
20 menos un ácido carboxílico de C_6-C_{18} o su intervalo de sal de 20 mM a 100 mM, tal como de 40 mM a 90 mM, u aproximadamente 60 mM a 90 mM. La concentración del ácido carboxílico de C_6-C_{18} o su sal se puede incrementar a 150-300 mM y el cosolvente caer a 1% o 10%. En modalidades representativas de la
25 invención, el ácido carboxílico es ácido octanóico, ácido

decanónico, o las sales correspondientes. Por ejemplo, se puede usar ácido caprílico 200 mM con 5% de propilenglicol o etanol. La reacción de conjugación se puede realizar a temperatura ligeramente elevado (30-35°C) y pH (8.2-8.7). La concentración del anticuerpo puede variar de 1 a 15 mg/ml y la concentración de un derivado de caliqueamicina, por ejemplo, éster de N-acetil-gamma-caliqueamicina DMH AcBut OSu puede variar de aproximadamente 4.5% a 11% en peso del anticuerpo. Se pueden determinar las condiciones adecuadas para la conjugación de otros fármacos, por aquéllos expertos en la técnica sin experimentación indebida.

II.C. Purificación de conjugados de anticuerpo/fármaco

Después de la conjugación, los conjugados monoméricos se pueden separar de reactivos no conjugados y/o formas agregadas de los conjugados por métodos convencionales, por ejemplo, cromatografía de exclusión de tamaño (SEC), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de intercambio iónico (IEC), o cromatoenfoco (CF). Los conjugados purificados son monoméricos, y contienen usualmente de 3% a 10% en peso de fármaco. Los conjugados de anticuerpo/fármaco también se pueden purificar usando cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés), que ofrece algunas ventajas con respecto a SEC que incluyen (1) una capacidad para reducir de manera eficiente el

contenido de LCF así como el agregado; (2) acomodo de grandes volúmenes de reacción; y (3) dilución mínima del producto. Los medios de HIC de alta capacidad adecuados para uso a escala de producción incluyen medio cromatográfico de Flujo Rápido de Fenil-Sefarosa 6, medio cromatográfico de Flujo Rápido de Butil-Sefarosa 4, medio cromatográfico de Flujo Rápido de Octal-Sefarosa 4, medio cromatográfico de Toyopearl Ether-650M, medio de HIC de Macro-Prep metil o medio de HIC de Macro-Prep t-butil. También se puede usar ultrafiltración/diafiltración para intercambio de amortiguador.

En un proceso representativo de purificación, se realizan múltiples pasos, incluyendo un paso de remoción celular por centrifuga, un paso de captura por afinidad de proteína A seguido por uno o dos pasos de pulido cromatográfico ortogonal, un paso de filtración de virus, y un paso de filtración de flujo tangencial para concentración y formulación. El proceso de purificación produce de manera preferente producto con menos de 5% de agregado, menos de 20ppm de proteína A, menos de 50ppm de proteína de célula hospedadora, y recuperación completa de más de 50%

Una preparación típica de anti-5T4/caliqueamicina contiene terminantemente (aproximadamente 95%) de anticuerpo conjugado que contiene 5-7 moles de caliqueamicina por molde anticuerpo. El conjugado se ha preparado de manera

reproducible a escala de laboratorio (10-200 mg). La carga de fármaco, que se expresa como μg de caliqueamicina/mg de anticuerpo monoclonal, se determina al dividir la concentración de caliqueamicina ($\mu\text{g/mL}$) por la concentración de anticuerpo (mg/mL). Estos valores se determinan al medir la absorbancia de UV de la solución de conjugado a 280 nm y 310 nm. Es importante señalar que esto 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 se carga mayor que el promedio y algo del anticuerpo se carga menor que el promedio. El anticuerpo no conjugado (baja fracción conjugada), que se puede medir usando HIC-CLAR analítica (cromatografía líquida de alto desempeño con interacción hidrófoba), es la población de anticuerpo que tiene poca o ninguna caliqueamicina no conjugada. Este valor es una medida de la distribución de caliqueamicina en el anticuerpo y no afecta en general la cantidad de caliqueamicina dosificada. La caliqueamicina no conjugada, que se puede medir usando ELISA, se refiere a la cantidad de caliqueamicina que no se conjuga al anticuerpo y se expresa en términos de por ciento de caliqueamicina total. Los ensayos de carga de fármaco no diferencian entre caliqueamicina no conjugada y conjugada. La cantidad de caliqueamicina no conjugada es indetectable o insignificante cuando se usan ensayos de carga de fármaco, y por lo tanto estos ensayos

miden de manera efectiva la cantidad de caliqueamicina conjugada.

Se pueden usar métodos analíticos para valorar la liberación y prueba de estabilidad de conjugados de caliqueamicina anti-5T4 humanizados. Los conjugados se pueden evaluar para identidad (IEF), concentración (carga total de proteína y total de caliqueamicina), pureza (caliqueamicina no conjugada, anticuerpo conjugado poco, contenido de agregado y SDS-PAGE reducida), e inmunoafinidad (ELISA de unión a antígeno). Se pueden usar ensayos adicionales conocidos por aquéllos expertos en la técnica. Usando estos ensayos, se puede mantener la consistencia de lote a lote en la elaboración comercial.

15 III.D. Farmacocinética de conjugados de anticuerpo/-fármaco

La farmacocinética de inmunoconjugados dirigidos a 5T4 se puede evaluar y comparar a la farmacocinética de caliqueamicina no conjugada en varios animales. Por ejemplo, esto se puede hacer después de una administración de bolo intravenoso individual en ratones lampiños hembra, ratas Sprague-Dawley machos, y monos cynomologus hembras. La farmacocinética de un anticuerpo anti-5T4 se caracteriza en general por baja depuración, bajo volumen de distribución, y prolongada vida media terminal aparente en varias especies. Las concentraciones en suero de derivados de caliqueamicina no

conjugadas se espera que estén por abajo del límite de cuantificación. El perfil de toxicidad para estos conjugados en estudios de clasificación de toxicidad de dosis única se espera que sea similar a aquél obtenido para otros conjugados de anticuerpo/caliqueamicina a dosis comparables.

IV. Ensayos funcionales para caracterización de anticuerpo anti-5T4 y conjugados de anticuerpo/fármaco

La presente invención describe además ensayos *in vitro* e *in vivo* para caracterizar actividades de un anticuerpo anti-5T4, incluyendo actividad de unión a 5T4, internalización celular después de la unión al antígeno 5T4 presente en una superficie celular, y selección como objetivo de células que expresan 5T4 en un sujeto. Cuando se conjuga una citotoxina, los anticuerpos descritos de la invención pueden producir actividad anti-cáncer, incluyendo inhibición del crecimiento de células cancerígenas que expresan 5T4 y/o inducción de muerte celular en células que expresan 5T4. Los anticuerpos anti-5T4 de la invención pueden comprender una o más de las siguientes actividades.

Las técnicas para detectar la unión de anticuerpos anti-5T4 al antígeno 5T4 se conocen en la técnica, incluyendo, por ejemplo, ensayos BIACORE^{MR} como se describe en el Ejemplo 2. Las técnicas representativas adicionales incluyen centrifugación, cromatografía de afinidad y otros métodos

inmunológicos. Ver, por ejemplo Manson (1992) Inmunochemical Protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey, Estados Unidos de América; Ishikawa (1999) Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay, Elsevier, Amsterdam/New York. Se pueden realizar
5 ensayos de unión a antígeno usando antígeno 5T4 aislado o células que expresan 5T4. Ver Ejemplo 2.

La especificidad de unión de los anticuerpos anti-5T4 se puede describir adicionalmente por definición de un epítipo de unión, es decir, identificación de residuos,
10 incluyendo residuos no adyacentes que participan en la unión al antígeno, y/o la definición de residuos que influyen en la unión al antígeno. Ver Ejemplos 4-5.

Se puede valorar la internalización de anticuerpos anti-5T4 y conjugados de anticuerpo/fármaco por células que
15 expresan 5T4 al observar la cantidad de anticuerpos o conjugados unidos a la superficie de las células que expresan 5T4 durante el tiempo. En el Ejemplo 3 se describen técnicas representativas para valorar la localización en membrana de anticuerpos y conjugados de anticuerpo/-fármaco.

20 Los ensayos funcionales también incluyen métodos para valorar la actividad anti-cáncer de los conjugados de anticuerpo/fármaco, por ejemplo, una capacidad para destruir las células cancerígenas existentes, o para retrasar o prevenir el crecimiento de las células cancerígenas. Los
25 cánceres seleccionados como objetivos por los conjugados de

anticuerpo/fármaco de la invención incluyen tumores primarios y metastatizados y carcinomas de cualquier tejido en un sujeto, incluyendo carcinomas y malignidades hematopoyéticas tal como leucemias y linfomas.

5 Los anticuerpos anti-5T4 que tienen actividad inhibidora de crecimiento pueden eliminar células que expresan 5T4 o prevenir o reducir la proliferación de células que expresan 5T4. Los métodos representativos para valoración rápida *in vitro* de inhibición de crecimiento celular se describen en Jones et al. (2001) *J. Immunol, Methods* 254:85-10 98.

Los anticuerpos anti-5T4 también pueden comprender la capacidad para inducir muerte celular, por ejemplo, muerte celular programada caracterizada por degradación de ADN nuclear, degeneración nuclear y condensación, pérdida de integridad de membrana, y fagocitosis. Los ensayos representativos para valorar las células se describen en Hoves 15 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.* 51:873-885. 20

Por ejemplo, para valorar la citotoxicidad de los conjugados de anticuerpo anti-5T4/caliqueamicina *in vitro*, se cultivan células MDAMB435/5T4 (células de carcinoma de mama humano que sobreexpresan el antígeno 5T4 humano) y células 25 MDAMB435/neo (células de control) en la presencia de

conjugados de anticuerpo-caliqueamicina o caliqueamicina libre, esencialmente como se describe por Boghaert et al. (2004), *Clin. Cancer Res.*, 10:4538-4549. La citotoxicidad de cada agente se reporta como ED50 (ng/ml), que es la cantidad de caliqueamicina dada como conjugado o como fármaco libre que provoca 50% de reducción de un cultivo celular con relación a un control no tratado. El número de células en cultivo se determina usando un tinte vital (MTS) después de la exposición al fármaco. Ver también Ejemplo 6.

La citotoxicidad de los conjugados de anticuerpo/caliqueamicina también se puede valorar usando células MDAMB435/5T4 y MDAMB435/neo cultivadas de una manera adecuada para crecimiento de esferoides. Las células se cultivan en la presencia de conjugados de anticuerpo/caliqueamicina o caliqueamicina libre, y después de la exposición del fármaco, se determinan las dimensiones de cada esferoide. La eficiencia de cada agente al inhibir el crecimiento de esferoides se reporta como ED50 (ng/ml), es decir, la cantidad de caliqueamicina dada como conjugado o como fármaco libre que provoca 50% de inhibición del crecimiento de esferoides con relación al contorno tratado. Ver Ejemplo 6.

Para valorar la citotoxicidad de los conjugados de anticuerpo anti-5T4/caliqueamicina *in vivo*, se preparan tumores en ratones lampiños por inyección subcutánea de

células MDAMB435/5T4 (células de carcinoma de mama humano que sobreexpresan el antígeno 5T4 humano), células NCI-H157 (células cancerígenas de pulmón humano de células no pequeñas), células PC14PE6 (células cancerígenas de pulmón humano de células no pequeñas), o células N87 (células de carcinoma gástrico humano). Los conjugados de anticuerpo/caliqueamicina y los compuestos de control se administran a ratones que tienen tumor, por ejemplo, por inyección intraperitoneal en un total de tres dosis dadas a intervalos de 4 días, por ejemplo, en los días 1, 5 y 9. Los resultados terapéuticos medibles incluyen inhibición del crecimiento de las células tumorales.

Para valorar adicionalmente la capacidad de selección de objetivo de los conjugados de anticuerpo anti-5T4/caliqueamicina, se puede usar un modelo ortotópico para cáncer de células no pequeñas y de células pequeñas, esencialmente como se describe por Onn et al. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9(15):5532-5539. De manera concisa, células de adenocarcinoma pulmonar humano (PC14PE6) se inyectan en venas de la cola de ratones lampiños, que entonces migran para formar tumores en el pulmón. Los tumores pueden aparecer como nódulos sólidos en el parénquima pulmonar y provocan efusiones pleurales hemorrágicas que contienen células tumorales suspendidas. Se administran los compuestos de control y los conjugados de anticuerpo/caliqueamicina a los ratones que

1 tienen tumor, por ejemplo, por inyección intraperitoneal
empezando en 6 días después de la inyección de las células
tumoraes durante un total de 3 dosis dadas a intervalos de 4
días, por ejemplo, en los días 6, 10 y 14. Los resultados
5 terapéuticos medibles incluyen efusiones pleurales reducidas y
supervivencia incrementada.

V. Usos de anticuerpos anti-5T4 y conjugados de anticuerpo/fármaco

10 Los anticuerpos anti-5T4 y los conjugados de anticuerpo/fármaco de la invención son útiles tanto *in vitro* como *in vivo* para aplicaciones relacionadas a células que expresan 5T4. Los cánceres que expresan 5T4 incluyen carcinoma pulmonar escamoso/adenomatoso (carcinoma pulmonar de células
15 no pequeñas), carcinoma invasivo de mama, carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico, carcinoma cervical escamoso, adenocarcinoma endometrial invasivo, carcinoma pancreático invasivo, carcinoma ovárico, carcinoma vesical escamoso, y coriocarcinoma. Se detecta 5T4 a altos niveles en carcinomas
20 de bronquios, mama, colon, recto, estómago, cerviz, endometrio, páncreas, ovarios, corio, y vesículas seminales.

V.A. Aplicaciones in Vitro

La presente invención proporciona métodos *in vitro*
25 que usan anticuerpos anti-5T4. Por ejemplo, se pueden usar los

anticuerpos descritos, ya sea solos o en combinación con agentes citotóxicos u otros fármacos para unirse específicamente a células cancerígenas positivas a 5T4 para agotar estas células de una muestra celular. También se proporcionan métodos para inducir apoptosis y/o inhibición de la proliferación celular mediante la puesta en contacto de las células que expresan 5T4 con un conjugado de anticuerpo/fármaco que comprende un anticuerpo anti-5T4 conjugado a una citotoxina. Se describen métodos *in vitro* representativos, anteriormente en la presente, bajo el encabezado de "Ensayos Funcionales para Caracterización de Anticuerpos Anti-5T4 y Conjugados de Anticuerpo/Fármaco".

Los anticuerpos anti-5T4 de la invención también tienen utilidad en la detección de células positivas a 5T4, *in vitro*, en base a su capacidad para unirse específicamente al antígeno 5T4. Un método para detectar células que expresan 5T4 puede comprender: (a) preparar una muestra biológica que comprende células; (b) poner en contacto un anticuerpo anti-5T4 con la muestra biológica *in vitro*; y (c) detectar la unión del anticuerpo anti-5T4. Para facilitar la detección, el anticuerpo se puede conjugar a una marca.

V.B. Detección *in Vitro* y Diagnóstico

También se pueden usar los anticuerpos anti-5T4 de la invención para métodos de detección *in vivo*, por ejemplo,

16
como útiles para diagnóstico, para proporcionar asistencia intraoperativa, o para determinación de dosis. Después de la administración de un anticuerpo anti-5T4 marcado a un sujeto, y después de un tiempo suficiente para la unión, se puede
5 visualizar la biodistribución de células que expresan 5T4 unidas por el anticuerpo. Los métodos de diagnóstico descritos se pueden usar en combinación con métodos de tratamiento. Además, se pueden administrar anticuerpos anti-5T4 de la invención para el propósito dual de detección y terapia.

10 Los métodos de detección no invasivos representativos incluyen escintigrafía (por ejemplo SPECT (Tomografía Computarizada de Emisión de Fotones Individuales), PET (Tomografía de Emisión de Positrones), formación de imágenes por cámara gamma, y exploración rectilínea),
15 formación de imágenes por resonancia magnética (por ejemplo, formación de imágenes por resonancia magnética convencional, formación de imágenes por transferencia de magnetización (MTI), espectroscopia de resonancia magnética de protones (MRS), formación de imágenes ponderada por difusión (DWI) y
20 formación de imágenes por MR funcional (fMRI)), y ultrasonido.

V.C. Aplicaciones Terapéuticas

La presente invención se refiere a métodos y composiciones útiles para inducir citólisis de células
25 cancerígenas que expresan 5T4 en un sujeto. Los conjugados de

166

anticuerpo anti-5T4/fármaco de la invención son útiles para inhibir el crecimiento de células cancerígenas y células de un trastorno proliferativo no neoplásico, tal como hiperplasia, metaplasia, o más particularmente, displasia (para revisión de estas condiciones de crecimiento anormal, ver DeVita Jr. Et a. (2001), Cancer: Principles and Practice, 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins.

Los cánceres adecuados para que se seleccionen como objetivo usando conjugados de anticuerpo anti-5T4/fármaco incluyen tumores primarios y metastáticos que expresan 5T4 en mama, colon, recto, pulmón, orofaringe, hipofaringe, esófago, estómago, páncreas, hígado, vesícula biliar, conductos biliares, intestino delgado, tracto urinario incluyendo riñón, vejiga y urotelio, tracto genital femenino, cerviz, útero, ovarios, tracto genital masculino, próstata, vesículas seminales, testículos, glándula endocrinal, glándula tiroides, glándula suprarrenal, glándula pituitaria, piel, hueso, tejidos blandos, vasos sanguíneos, cerebro, nervios, ojos, meninges. Otros cánceres pertinentes son leucemias y linfomas que expresan 5T4 (por ejemplo, linfoma de Hodgkin y linfoma no de Hodgkin), incluyendo leucemia o linfoma, indolente, agresiva, de bajo grado, de grado intermedio, o de alto grado.

En particular, se conoce que 5T4 se expresa en células de carcinoma pulmonar escamoso/adenomatoso (carcinoma pulmonar de célula no pequeña), carcinoma mamario invasivo,

carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico, carcinoma cervical escamoso, adenocarcinoma endometrial invasivo, carcinoma pancreático invasivo, carcinoma ovárico, carcinoma vesical escamoso y coriocarcinoma. Se detecta 5T4 a altos niveles en
5 carcinomas de bronquios, mama, colon, recto, estómago, cerviz, endometrio, páncreas, ovario, corión y vesículas seminales. La distribución en superficie celular del antígeno 5T4 puede ser homogénea o heterogénea. En carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico, y carcinoma ovárico, la expresión de 5T4
10 está directamente relacionada al progreso de la enfermedad. En carcinoma de mama, la intensidad incrementada de tinción de 5T4 en nódulos metastáticos se observa, sin embargo, no se correlaciona la expresión de 5T4 con la etapa de la enfermedad. Los cánceres también pueden expresar el antígeno
15 de carbohidrato de Lewis H, incluyendo carcinomas de mama, colon, gástrico, esofágico, pancreático, duodenal, pulmonar, de vejiga y renal y tumores neuroendócrinos de células de islote y gástricos. Ver patente de los Estados Unidos número 6,310,185.

20 De esta manera, los pacientes que se van a tratar con los conjugados de anti-5T4/fármaco de la invención se pueden seleccionar en base a la expresión del biomarcador, incluyendo pero no limitado a expresión elevada del antígeno 5T4, que da por resultado una población de pacientes
25 seleccionada para expresión objetiva enriquecida en lugar de

histología u origen tumoral. Se puede medir la expresión objetivo como una función del número de células que tiñen combinado con la intensidad de las células que tiñen. Por ejemplo, la clasificación de la alta expresión de 5T4 incluye
5 aquellos pacientes con más de 30% (es decir, 40%, 50% o 60%) de las células probadas para tinción inhumohistoquímica positiva para 5T4 a un nivel de 3+ (en una escala de 1 a 4), en tanto que la expresión moderada de 5T4 puede incluir aquellos pacientes con más de 20% de las células que tiñen a
10 1+ a 2+.

También se pueden usar biomarcadores diferentes de la expresión del antígeno 5T4 para selección de pacientes, incluyendo caracterización del tumor en base a la resistencia a múltiples fármacos (MDR), a manera de ejemplo. Casi 50 por
15 ciento de los cánceres humanos son ya sea completamente resistentes a quimioterapia o responden sólo de manera momentánea, después de lo cual no se afectan por más tiempo por fármacos anticáncer comúnmente usados. Este fenómeno se refiere como MDR y se expresa inherentemente por algunos tipos
20 de tumor, en tanto que otros adquieren MDR después de la exposición a tratamiento de quimioterapia. La bomba de efluvo de fármaco, P-glicoproteína, media la mayoría de la MDR asociada con quimioterapia citotóxica. El análisis fenotípico y funcional de los mecanismos de MDR presentes en
25 especímenes tumorales de pacientes con cáncer se puede llevar

a cabo a fin de relacionar los mecanismos específicos de MDR con la resistencia a quimioterapia en tipos específicos de tumor.

El crecimiento canceroso o proliferación anormal se
5 refiere a cualquiera de un número de índices que sugieren cambio dentro de las células a una forma de cáncer más desarrollada, o un estado de enfermedad. La inhibición del crecimiento de células cancerígenas o células de un trastorno proliferativo no neoplásico se puede valorar por métodos
10 conocidos en la técnica, tal como crecimiento tumoral retrasado e inhibición de metástasis. Otros índices para medir la inhibición del crecimiento de cáncer incluyen una disminución en la supervivencia de células cancerígenas, una disminución en el volumen tumoral o en la morfología (por
15 ejemplo, como se determina usando un método tomográfico computarizado (CT), sonografía, u otro método de formación de imágenes), la destrucción de vasculatura de tumor, desempeño mejorado en prueba cutánea de hipersensibilidad retrasada, un incremento en la actividad de linfocitos T citolíticos, y una
20 disminución en los niveles de los antígenos específicos de tumor.

En tanto que no se propone que se una por ningún modo único de operación, tanto la selección del objetivo guiada por antígeno así como la selección pasiva del objetivo
25 de conjugados de anticuerpo anti-5T4/fármaco pueden contribuir

a la eficiencia antineoplásica. La selección del objetivo guiada por antígeno se refiere al movimiento y/o acumulación preferencial de un péptido o análogo de péptido en un tejido objetivo (es decir, un tejido que comprende células que expresan 5T4 y el sitio propuesto para acumulación de un conjugado de anti-5T4/fármaco) en comparación con un tejido de control (es decir, un tejido sospechoso de carecer sustancialmente de células que expresan 5T4 y la unión y/o acumulación de un conjugado administrado de anti-5T4/fármaco).

10 La localización preferencial de un conjugado de anticuerpo/fármaco en general es tal que una cantidad de conjugado de anticuerpo/fármaco en un tejido objetivo es aproximadamente 2 veces mayor que una cantidad del conjugado de anticuerpo/fármaco en un tejido de control, tal como una

15 cantidad que es aproximadamente 5 veces o mayor, o aproximadamente 10 veces o mayor.

En general, la selección pasiva del objetivo se refiere al secuestro de anticuerpos o conjugados de anticuerpo/fármaco en un sitio tumoral debido a cambios

20 locales en la vasculatura. Por ejemplo, los conjugados de anti-5T4/fármaco pueden dejar la vasculatura en el sitio tumoral, que se abre a la producción incrementada de VEGF, la unión a células que expresan 5T4 y la activación de la internalización del conjugado de anti-5T4/fármaco. El pobre

25 drenaje venoso y linfático del tumor también da por resultado

el secuestro de conjugados de anti-5T4/fármaco no unidos. Los anticuerpos conjugados a fármacos con ligadores de ácidos biliares pueden liberar el fármaco, que entonces se difunde en las células tumorales. Los efectos antineoplásicas de la selección pasiva de objetivo no son permanentes o tan potentes como aquellos inducidos por la selección de objetivo guiada por antígeno, pero pueden contribuir a la eficiencia total.

V.D. Formulaciones

Los anticuerpos anti-5T4 y los conjugados de anti-5T4/fármaco de la invención se preparan fácilmente y se formulan para uso clínico seguro y eficaz. Las formulaciones adecuadas para la administración a un sujeto incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener anti-oxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos, agentes antibacterianos y antifungoideos (por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, y timerosal), solutos que vuelven isotónica la formulación con los fluidos corporales del receptor propuesto (por ejemplo, azúcares, sales y polialcoholes), agentes de suspensión y agentes espesantes. Los solventes adecuados incluyen agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), y mezclas de los mismos. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitarias o de múltiples dosis, por ejemplo, ampolletas y

frascos sellados, y se puede almacenar en una condición congelada o liofilizada (secada por congelación) que requiere sólo la adición de un portador líquido estéril inmediatamente antes del uso para administración a un sujeto o para radiomarcación subsiguiente con un isótopo apropiado para la aplicación propuesta. Los anticuerpos anti-5T4 y los conjugados de anticuerpo/fármaco de la invención se formulan de manera preferente como una dosis efectiva, como se describe más adelante.

10 Como un ejemplo, un anticuerpo anti-5T4 representativo o formulación de conjugado de anti-5T4/fármaco representativa comprende una formulación de múltiples dosis de 40 mg/ml de anticuerpo o conjugado de anticuerpo/fármaco, acetato 25 mM, trehalosa 150 mM, 0.9% de alcohol bencílico, 15 0.02% de polisorbato 20 a pH 5.0, y que tiene una vida mínima en anaquel de almacenamiento de dos años a 2-8°C. Como otro ejemplo, un formulación de anticuerpo anti-5T4 o de conjugado de anti-5T4/fármaco puede comprender 10 mg/ml de anticuerpo o conjugado de anticuerpo/fármaco en 9.0 mg/ml de cloruro de 20 sodio, 7.35 mg/ml de dihidrato de citrato de sodio, 0.7 mg/ml de polisorbato 80, y agua estéril, pH 6.5. Las formulaciones representativas de un conjugado de anti-5T4/caliqueamicina para administración a modelos experimentales de ratón incluyen 2 µg o 4 µg de caliqueamicina (ver Ejemplos 3, 4 y 7), que se 25 pueden poner a otra escala por consiguiente para

administración a humanos.

Una formulación liofilizada estable de un anticuerpo anti-5T4 o conjugado de anticuerpo/fármaco se puede preparar al (a) disolver un conjugado de anticuerpo/fármaco a una 5 concentración final de 0.5 a 2 mg/ml en una solución que comprende un crioprotector a una concentración de 1.5%-5% en peso, un agente volumétrico 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 solubilidad a una 10 concentración de 0.005% a 0.05% en peso, agente amortiguador a una concentración de 5-50 mM tal que el pH final de la solución sea 7.8-8.2, y agua; (b) dispensar la solución anterior en frascos a una temperatura de +5°C a +10°C; (c) congelar la solución a una temperatura de congelación de -35°C 15 a -50°C; (d) someter la solución congelada a un paso inicial de secado por congelación a una presión primaria de secado de 20 a 80 micrones a una temperatura de anaquel de -10°C a -40°C durante 24 a 78 horas; y (e) someter el producto secado por congelación del paso (d) a un paso secundario de secado a una 20 presión de secado de 20 a 80 micrones a una temperatura de anaquel de +10°C a +35°C durante 15 a 30 horas.

Los crioprotectores representativos útiles para liofilización del crioprotector incluyen alditol, mannitol, sorbitol, inositol, polietilenglicol, ácido aldónico, ácido 25 urónico, ácido aldárico, aldosas, cetosas, amino-azúcares,

alditoles, inositoles, gliceraldehídos, arabinosa, lixosa, pentosa, ribosa, xilosa, galactosa, glucosa, hexosa, idosa, mannososa, talosa, heptosa, glucosa, fructuosa, ácido glucónico, sorbitol, lactosa, mannitol, metil- α -glucopiranosido, maltosa, 5 ácido isoascórbico, ácido ascórbico, lactona, sorbosa, ácido glucárico, eritrosa, treosa, arabinosa, alosa, astrosa, gulosa, idosa, talosa, eritrulosa, ribulosa, xilulosa, psicosa, tagatosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido galacturónico, ácido mannurónico, 10 glucosalina, galactosamina, sacarosa, trehalosa, ácido neuramínico, arabinanos, fructanos, fucanos, galactanos, galacturonanos, glucanos, mananos, xilanos, levano, fucoidano, carragaen, galactocarolosa, pectinas, ácidos pécticos, amilasa, pululano, glicógeno, amilopectina, celulosa, 15 dextrano, pustulano, quitina, agarosa, queratina, condroitina, dermatano, ácido hialurónico, ácido algínico, goma de xantano, almidón, sacarosa, glucosa, lactosa, trehalosa, etilenglicol, polietilenglicol, polipropilenglicol, glicerol y pentaeritritol.

20 Por ejemplo, el crioprotector sacarosa se puede usar a una concentración de 1.5% en peso, el agente volumétrico polimérico Dextrano 40 o hidroxietil-almidón 40 se puede usar a una concentración de 0.9% en peso, el electrolito usado en la solución de liofilización es cloruro de sodio, que está 25 presente a una concentración de 0.05 M, y el agente

amortiguador trometamina se puede usar a una concentración de 0.02 M. También se puede usar un agente facilitador de solubilidad (por ejemplo, un agente tensioactivo tal como Polisorbato 80) durante el proceso de liofilización.

5 Usualmente, este agente facilitador de solubilidad es un agente tensioactivo. Los pasos representativos para la preparación de una formulación liofilizada incluyen congelar los frascos a una temperatura de -45°C; la solución congelada se somete a un paso inicial de secado por congelación a una

10 presión primaria de secado de 60 micrones y a una temperatura de anaquel de -30°C durante 60 horas; y someter el producto secado por congelación a un paso secundario de secado a una presión de secado de 60 micrones a una temperatura de anaquel de +25°C durante 24 horas.

15 Los anticuerpos anti-5T4 y los conjugados de anticuerpo/fármaco se formulan en un portador farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, macromoléculas grandes lentamente metabolizadas tal como proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos,

20 ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas inactivas de virus. También se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tal como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos

25 orgánicos, tal como acetatos, propionatos, malonatos y

benzoatos. Las formulaciones pueden contener adicionalmente líquidos tal como agua, solución salina, glicerol, y etanol y/o sustancias auxiliares, tal como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias amortiguadoras de pH, pueden estar presentes en estas composiciones. Estos portadores permiten que las composiciones se formulen como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas y suspensiones, para ingestión por el paciente.

10 V.E. Dosis y Administración

Los anticuerpos anti-5T4 y los conjugados de anti-5T4/fármaco de la invención se pueden administrar de manera parenteral, por ejemplo, mediante administración intravascular, subcutánea, intraperitoneal, o intramuscular.

15 Para distribución de las composiciones a rutas pulmonares, las composiciones se pueden administrar como un aerosol o aspersión gruesa, es decir, administración transnasal. Se puede usar la administración intratecal, intramedular o intraventricular para tratamiento de cánceres del sistema

20 nervioso central (SNC, por sus siglas en inglés) y cánceres relacionados al SNC. También, los anticuerpos anti-5T4 y los conjugados de anti-5T4/fármaco se pueden administrar de manera transdérmica, transcutáneamente, de manera tópica, enteralmente, de manera intravaginal, sublingualmente o de

25 manera rectal. La administración intravenosa puede ser usada

por rutina en la clínica. Se selecciona un método de distribución a consideración tal como la condición y sitio que se va a tratar, el tipo de formulación de anticuerpo, y la eficiencia terapéutica de la composición.

5 La presente invención prevé que una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-5T4 y conjugado de anti-5T4/fármaco se administra a un sujeto, es decir, una cantidad de un anticuerpo anti-5T4 o conjugado de anti-5T4/fármaco suficiente para producir una respuesta biológica deseada. Por
10 ejemplo, cuando se administra a un sujeto que tiene cáncer, una cantidad efectiva comprende una cantidad suficiente para producir actividad anti-cáncer, incluyendo citólisis de células cancerígenas, inhibición de proliferación de células cancerígenas, inducción de apoptosis de células cancerígenas,
15 reducción de antígenos de células cancerígenas, crecimiento tumoral retrasado y/o inhibición de metástasis. Es bien aceptado el encogimiento tumoral como un marcador sustituto clínico para eficacia. Otro marcador bien aceptado para eficacia es la supervivencia libre de progreso. Los
20 conjugados de anti-5T4/caliquemamicina demuestran en general al menos una mejora de 25% en los parámetros de eficiencia clave, tal como mejora en supervivencia media, tiempo a progreso tumoral, y velocidad total de respuesta.

En general, una dosis efectiva estará en el
25 intervalo de aproximadamente 0.01 mg/m² a aproximadamente 50

mg/m², tal como de aproximadamente 0.1 mg/m² a aproximadamente 20 mg/m², o aproximadamente 15 mg/m², dosis que se calcula en base a la cantidad de anticuerpo anti-5T4. Una dosis efectiva de un conjugado de anti-5T4/fármaco también se puede calcular en base a una cantidad del fármaco conjugado. Por ejemplo, las dosis representativas de un conjugado de anti-5T4/caliqueamicina para la administración a modelos experimentales de ratón incluyen 2 µg ó 4 µg de caliqueamicina, que se puede poner a otra escala por consiguiente para administración a humanos. Por ejemplo, los conjugados de anti-5T4/caliqueamicina de la invención se pueden administrar a pacientes humanos una vez cada 3 semanas durante hasta 6 ciclos. Para un anticuerpo anti-5T4 radiomarcado, una dosis efectiva está típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 mCi a aproximadamente 300 mCi, normalmente de aproximadamente 5 mCi a 100 mCi, dependiendo del radioisótopo y la afinidad de unión del anticuerpo.

Para detección de células positivas a 5T4 usando los anticuerpos anti-5T4 descritos, se administra una cantidad detectable de una composición de la invención, a un sujeto, es decir, una dosis de un anticuerpo anti-5T4 tal que se pueda determinar la presencia del anticuerpo *in vitro* o *in vivo*. Para formación escintigráfica de imágenes usando radioisótopos, las dosis típicas de un radioisótopo pueden

incluir una actividad de aproximadamente 10 μ Ci a 50 mCi, o aproximadamente 100 μ Ci a 25 mCi, o aproximadamente 500 μ Ci a 20 mCi, o aproximadamente 1 mCi a 10 mCi, o aproximadamente 10 mCi.

5 Las dosis reales de niveles de los ingredientes activos en una composición de la invención se pueden variar para administrar una cantidad de la composición que es efectiva para lograr el resultado terapéutico o diagnóstico deseado. También se pueden variar los regímenes de
10 administración. Se puede usar una inyección única o múltiples inyecciones. El nivel seleccionado de dosis y el régimen seleccionado dependerán de una variedad de factores que incluyen actividad y estabilidad (es decir, vida media) de la composición terapéutica, formulación, la ruta de
15 administración, combinación con otros fármacos o tratamientos, la enfermedad o trastorno que se va a detectar y/o tratar, y la condición física o historial médico previo del sujeto que se trata.

20 Para los anticuerpos anti-5T4 y los conjugados de anti-5T4/fármaco de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva se puede estimar inicialmente ya sea en ensayos de cultivo celular o en modelos de animales, tal como roedores, conejos, perros, cobayos y/o primates. El modelo de animal también se puede usar para determinar el intervalo apropiado

de concentración y la ruta apropiada de administración. Esta información entonces se puede usar para determinar dosis útiles de rutas para la administración en humanos. Típicamente, se administra una dosis mínima, y la dosis se incrementa en la ausencia de citotoxicidad limitante de dosis. La determinación y el ajuste de una cantidad efectiva o dosis efectiva, así como la evaluación de cuando y como hacer estos ajustes, se conocen por los expertos en la técnica de medicina.

10 Para terapias de combinación, se administran anticuerpos anti-5T4, conjugados de anti-5T4/fármaco, y/o agentes terapéuticos o de diagnóstico adicionales dentro de un cuadro de tiempo adecuado para la realización de la terapia o diagnóstico propuesta. De esta manera, los agentes individuales
15 se pueden administrar de una manera sustancialmente simultanea (es decir, como una formulación única o dentro de minutos u horas) o de manera consecutiva en cualquier orden. Por ejemplo, se pueden administrar tratamientos de agentes individuales en el espacio de aproximadamente 1 año uno del
20 otro, tal como en el espacio de aproximadamente 10, 8, 6, 4 o 2 meses, o en el espacio de 4, 3, 2, o 1 semanas, o en el espacio de aproximadamente 5, 4, 3, 2, o 1 días.

Para guía adicional con respecto a la formulación, dosis, régimen de administración y resultados terapéuticos
25 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.

15 V.F. Terapias de Combinación

Los anticuerpos anti-5T4 y conjugados de anti-5T4/fármaco, descritos, se pueden administrar como un tratamiento inicial, o para tratamiento de condiciones que son insensibles a terapias convencionales. Además, los anticuerpos anti-5T4 y los conjugados de anti-5T4/fármaco se pueden usar en combinación con otras terapias (por ejemplo, escisión quirúrgica, radiación, fármacos anti-cáncer adicionales, etc.), para producir de este modo efectos terapéuticos aditivos y potenciados y/o reducir hepatocitotoxicidad de algunos agentes anticancerígenos. Los anticuerpos anti-5T4 y los

conjugados de anti-5T4/ fármaco de la invención se pueden co-administrar o co-formular con agentes adicionales, o formular para administración consecutiva con agentes adicionales en cualquier orden.

5 Los agentes representativos útiles para terapia de combinación incluyen cualquiera de los fármacos descritos anteriormente en la presente como útiles para la preparación de conjugados de anti-5T4/fármaco. Los anticuerpos anti-5T4 y los conjugados de anti-5T4/fármaco de la invención también se
10 pueden usar en combinación con otros anticuerpos terapéuticos y conjugados de anticuerpo/fármaco, incluyendo anticuerpos anti-5T4 diferentes de los anticuerpos anti-5T4 descritos, así como anticuerpos y conjugados que tienen como objetivo un diferente antígeno. Los anticuerpos representativos que se
15 pueden usar solos o como un conjugado de anticuerpo/fármaco, incluyen anticuerpos anti-CD19, anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, RITUXAN^{MR}, ZEVALIN^{MR}, BEXXAR^{MR}), anticuerpos anti-CD22, anticuerpos anti-CD33 (por ejemplo, MYLOTARG^{MR}), conjugados de anticuerpo anti-CD33/fármaco, anticuerpos anti-Lewis Y (por
20 ejemplo, Hu3S193, Mthu3S193, AGmthu3S193), anticuerpos anti-HER-2 (por ejemplo, HERCEPTIN^{MR} (trastuzumab), MDX-210, OMNITARG^{MR} (pertuzumab, rhuMab 2C4)), anticuerpos anti-CD52 (por ejemplo, CAMPATH^{MR}), anticuerpos anti-EGFR (por ejemplo, ERBITUX^{MR} (cetuximab), ABX-EGF (panitumumab)), anticuerpos
25 anti-VEGF (por ejemplo, AVASTIN^{MR} (bevacizumab)), anticuerpos

anti-complejo de ADN/histona (por ejemplo, ch-TNT-1/b), anticuerpos anti-CEA (por ejemplo, CEA- Cide, YMB-1003) hLM609, anticuerpos anti-CD47, (por ejemplo, 6H9), hLM609 anti-VEGFR2 (o receptor que contiene dominio de inserción de cinasa, KDR) (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 anti-receptor de progesterona (por ejemplo, 2C5), anticuerpos anti-CA19.9 (por ejemplo, GIVAREX^{MR}) y anticuerpos anti-fibrina (por ejemplo, MH-1).

Los conjugados de anticuerpo anti-5T4/fármaco se pueden administrar también conjuntamente con una o más combinaciones de agentes citotóxicos como parte de un régimen de tratamiento. Las preparaciones citotóxicas útiles para este propósito incluyen CHOPP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona y procarbazona); CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona); COP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona); CAP-BOP (ciclofosfamida, doxorubicina, procarbazona, bleomicina, vincristina y prednisona); m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona, y leucovorina); ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etoposido, leucovorina, mecloetamina, vincristina, prednisona y procarbazona); ProMACE-CitaBOM (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida,

etopósido, leucovorina, citarabina, bleomicina y vincristina);
MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida,
vincristina, prednisona, bleomicina y leucovorina); MOPP
(mecloetamina, vincristina, prednisona y procarbazona); ABVD
5 (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina y
dacarbazina); MOPP (mecloetamina, vincristina, prednisona y
procarbazona) alternando con ABV (adriamicina/doxorubicina,
bleomicina, vinblastina); MOPP (mecloetamina, vincristina,
prednisona y procarbazona) alternando con ABVD
10 (adriamicina/doxorubicina, bleomicina, vinblastina y
dacarbazina); ChIVPP (clorambucilo, vinblastina, procarbazona,
prednisona); IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato, etopósido);
MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato, etopósido); DHAP
(dexametasona, citarabina de alta dosis y cisplatina); ESHAP
15 (etopósido, metilprednisolona, citarabina HD, y cisplatina);
CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósida, procarbazona, prednisona y
bleomicina); CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina y
prednisona); y CVP- 1 (ciclofosfamida, vincristina y
prednisona); DHAP (cisplatina, citarabina de alta dosis y
20 dexametasona); CAP (ciclofosfamida, doxorubicina, cisplatina);
PV (cisplatina, vinblastina o vindesina); CE (carboplatina,
etopósido); EP (etopósido, cisplatina); MVP (mitomicina,
vinblastina o vindesina, cisplatina); PFL (cisplatina, 5-
flurouracilo, leucovorina); IM (ifosfamida, mitomicina); IE
25 (ifosfamida, etopósido); IP (ifosfamida, cisplatina); MIP

(mitomicina, ifosfamida, cisplatina); ICE (ifosfamida, carboplatina, etopósido); PIE (cisplatina, ifosfamida, etopósido); Viorelbina y cisplatina; Carboplatina y paclitaxel; CAV (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina);
5 CAE (ciclofosfamida, doxorubicina, etopósido); CAVE (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, etopósido); EP (etopósido, cisplatina); y CMCCV (ciclofosfamida, metotrexato, lomustina, vincristina).

Los anticuerpos anti-5T4 y los conjugados de anti-
10 5T4/caliqueamicina se pueden usar en combinación con fármacos sistémicos anticancerígenos, tal como epitilonas (BMS-247550, Epo-906), reformulaciones de taxanos (Abraxane, Xiotax), inhibidores de microtubulina (MST-997, TTI-237), o con citotoxinas dirigidas al objetivo tal como CMD-193 y SGN-15.
15 Los agentes anticancerígenos útiles adicionales incluyen TAXOTERE^{MR}, TARCEVA^{MR}, GEMZAR^{MR} (gemcitabina), 5-FU, AVASTIN^{MR}, ERBITUX^{MR}, TROVAX^{MR}, anatumomab mafenatox, letrozol, docetaxel, y antraciclinas.

Para terapias de combinación, un anticuerpo anti-
20 5T4, un conjugado de anti-5T4/fármaco y/o uno o más agentes terapéuticos de diagnóstico adicionales se administran dentro de un marco de tiempo adecuado para la realización de la terapia o diagnóstico propuesto. De esta manera, los agentes individuales se pueden administrar de manera sustancialmente
25 simultánea (es decir, como una formulación individual o en el

espacio de minutos u horas) o de manera consecutiva en cualquier orden. Por ejemplo, los tratamientos con agentes individuales se pueden administrar en el espacio de aproximadamente 1 año uno del otro, tal como en el espacio de aproximadamente 10, 8, 6, 4, o 2 meses o en el espacio de 4, 3, 2, o 1 semanas, o en el espacio de aproximadamente 5, 4, 3, 2, o 1 días. La administración de un anticuerpo anti-5T4 o conjugado de anti-5T4/caliquemamicina en combinación con un segundo agente terapéutico produce de manera preferente un mayor efecto que la administración de cualquiera solo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se han incluido 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 normales de laboratorio de los co-inventores. En vista de la presente descripción y el nivel general de habilidad en la técnica, aquellos expertos apreciarán que los siguientes ejemplos se proponen para que sean sólo de ejemplo y que se pueden emplear numerosos cambios, modificaciones y alteraciones sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1

Anticuerpos Anti-5T4 Murinos

Se prepararon anticuerpos anti-5T4 en ratones usando el antígeno 5T4 humano y métodos normales para inmunización.

5 Se produjeron líneas de células de hibridoma que producen los anticuerpos A1, A2 y A3 por la fusión de células B individuales con células de mieloma.

Las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos A1, A2 y A3 anti-5T4 se clonaron
10 usando el sistema de síntesis de ADNc SMART^{MR} (Clontech Laboratories Inc. of Mountain View, California) seguido por amplificación por PCR. El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total aislado de células de hibridoma de A1, A2, o A3, usando oligo(dT) y el oligo de SMART^{MR} IIA (Clontech
15 Laboratories Inc.), con transcriptasa inversa POWERSCRIPT^{MR} (Clontech Laboratories Inc.). El ADNc entonces se amplificó por PCR usando un cebador que se fija a la secuencia de oligo SMART^{MR} IIA y el cebador específico de la región constante de ratón (Kappa de ratón para la cadena ligera, IgG2a de ratón
20 para la cadena pesada A1, IgG2b de ratón para la cadena pesada A2, e IgG1 de ratón para la cadena pesada A3) con la polimerasa VENT^{MR} (New England Biolabs Inc. of Ipswich, Massachusetts). Los productos de PCR de región variable de
25 expresión pED6 y se determinó la secuencia de ácido nucleico.

Este método es ventajoso ya que no se requiere conocimiento anterior de la secuencia de ADN. Además, la secuencia de ADN resultante no se altera por el uso de cebadores degenerados de PCR.

5 Las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de cadena pesada A1, A2 y A3 se exponen como nucleótidos 58-414 de SEQ ID NO:1, nucleótidos 55-405 de SEQ ID NO:5, y nucleótidos 58-423 de SEQ ID NO:9, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de
10 cadena pesada A1, A2 y A3 se exponen como residuos 20-138 de SEQ ID NO:2, residuos 19-135 de SEQ ID NO:6, y residuos 20-141 de SEQ ID NO:10, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de cadena ligera A1, A2 y A3 se exponen como nucleótidos 61-381 de SEQ ID NO:3, nucleótidos 67-390 de SEQ ID NO:7, y nucleótidos 61-381 de SEQ
15 ID NO:11, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera A1, A2 y A3 se exponen como residuos 21-127 de SEQ ID NO:4, residuos 23-130 de SEQ ID NO:8, y residuos 21-127 de SEQ ID NO:12, respectivamente. Ver
20 también Figuras 1A-1C.

Para valorar la novedad de las secuencias de región variable anti-5T4, A1, A2 y A3, se llevaron a cabo búsquedas de BLASTp para secuencias de búsqueda de proteína) usando los parámetros por omisión de Expectación=10, Tamaño de Palabra=3,
25 un filtro de baja complejidad, y la matriz BLOSUM62, que

permite costos de separación de existencia=11, y extensión=1. Se llevaron a cabo búsquedas BLASTn (para secuencias de búsqueda de nucleótidos) usando los parámetros por defecto o por omisión de Expectación=10, Tamaño de Palabra=11, y un
5 filtro de baja complejidad. Los resultados de la búsqueda BLAST SE REPORTA COMO UNA LISTA DE SECUENCIAS relacionadas a la secuencia de búsqueda, clasificadas en orden de valor E, que es un indicador del significado estadístico de las correspondencias identificadas en la base de datos. Las
10 secuencias más cercanamente relacionadas a las secuencias de región variable usadas para análisis BLAST se identifican en la Tabla 1 (BLASTn) y la Tabla 2 (BLASTp).

15 Tabla 1
Análisis BLASTn

	Secuencia de Búsqueda	Identidad (%) de Secuencia a Sujeto Más Cercana	Descripción de Secuencia a Sujeto Más Cercana
20	A1 VH (SEQ ID NO:1)	97 %	gi 31322165 gb AY169686.1 . Precursor de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina de clon VGBC1.13 de Mus musculus, gen, cds parcial.

5

10

15

20

25

Secuencia de Búsqueda	Identidad (%) de Secuencia a Sujeto Más Cercana	Descripción de Secuencia a Sujeto Más Cercana
A1 VH (SEQ ID NO:3)	96 %	gi 804922 dbj D50385.1 MUSIKCVRJ. ARNm de Mus musculus para región variable de cadena kappa de inmunoglobulina, secuencia parcial, células_línea:K3F10.
A1 VH (SEQ ID NO:5)	97 %	gi 11612012 gb AF303853.1 AF303853. ARNm de región variable de cadena pesada de inmunoglobulina de clon J558.22 de Mus musculus, cds parcial.
A1 VH (SEQ ID NO:7)	97 %	gi 1556423 emb X79906.1 MMMABMST2. ARNM de M. musculus para cadena ligera de anticuerpo MST2 monoclonal.
A1 VH (SEQ ID NO:9)	99 %	gi 3420272 gb AF064445.1 AF064445. Gen de región variable (Vh10.2) de cadena pesada de inmunoglobulina de Mus musculus, alelo Vh10.2a, cds parcial.
A1 VH (SEQ ID NO:11)	98 %	gi 2906107 gb AF045512.1 AF045512. Región variable de cadena ligera Kappa de anticuerpo monoclonal 9E10 de Mus musculus, ARNm (IgK), cds parcial.

Tabla 2
Análisis BLASTp

5

10

15

20

25

Secuencia de búsqueda	Identidad (%) de Secuencia Sujeto más Cercana	Descripción de Secuencia de Sujeto más Cercana
A1 VH (SEQ ID NO: 2)	84 %	gi 15865327 emb CAC82228.1 cadena pesada de inmunoglobulina [Mus musculus]
A1 VH (SEQ ID NO: 4)	93 %	gi 644862 gb AAA62143.1 región V de cadena kappa de inmunoglobulina anti-integrina alfa 4
A2 VH (SEQ ID NO: 6)	85 %	gi 15149453 gb AAK85298.1 anticuerpo de cadena individual HFN7.1 [construcción sintéticaÇ
A2 VH (SEQ ID NO: 8)	95 %	gi 297678 emb CAA80086.1 región variable de inmunoglobulina [Mus musculus domésticos]
A3 VH (SEQ ID NO: 20)	90 %	gi 2906050 gb AAC04511.1 cadena pesada de anticuerpo monoclonal anti-poli(dC) [Mus musculus]
A3 VH (SEQ ID NO: 12)	97 %	gi 2906108 gb AAC04540.1 cadena ligera kappa de anticuerpo monoclonal [Mus musculus]

Ejemplo 2

Especificidad de Unión y Afinidad de Anticuerpos Murinos Anti-5T4

Para valorar la especificidad de unión y la afinidad de los anticuerpos A1, A2 y A3, se realizó el análisis BIACORE^{MR} usando el antígeno 5T4 humano inmovilizado en un chip CM5. La tecnología BIACORE^{MR} utiliza cambios en el índice de refracción en la capa superficial en la unión del anticuerpo al antígeno 5T4 inmovilizado en la capa. Se detecta la unión por resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) de luz láser que se refracta de la superficie. El análisis de la constante de asociación y constante de disociación de la cinética de la señal permite la discriminación entre interacciones no específicas y específicas. Se usó como un control el anticuerpo H8 anti-5T4. H8 es un anticuerpo de IgG1 de ratón monoclonal generado por hibridoma descrito en la Publicación Internacional PCT No. WO 98/55607 y en Forsberg et al. (1997) J. Biol. Chem. 272 (19): 124430-12436.

Tabla 3

Resultados de Ensayo BIACORE^{MR}

Anticuerpo	KD (M)	KA (1/M)	kd (1/s)	kg (1
H8	4.1 X 10 ⁻¹⁰	2.5 X 10 ⁹	5.1 X 10 ⁻⁵	1.3 X 10 ⁵
A1	4.1 X 10 ⁻¹⁰	1.6 X 10 ⁹	1.3 X 10 ⁻⁴	2.0 X 10 ⁵
A2	1.5 X 10 ⁸	6.5 X 10 ⁷	8.7 X 10 ⁻⁴	5.6 X 10 ⁴
A3	2.2 X 10 ⁻⁹	4.6 X 10 ⁸	5.2 X 10 ⁻⁵	2.4 X 10 ⁴

Los resultados de BIACORE^{MR} muestran que los anticuerpos H8 y A1 tienen mayor afinidad para 5T4 en comparación a los anticuerpos A2 y A3. A2 es un anticuerpo de una afinidad relativamente baja. Están presentes cisteínas inusuales en el residuo 67 de la región variable de cadena pesada A1 y el residuo 91 de la región variable de cadena pesada A3. El reemplazo de estos residuos con fenilalanina (A1) o tirosina (A3) no altera las propiedades de unión del anticuerpo o los niveles de expresión del anticuerpo.

La afinidad de unión de los anticuerpos H8, A1, A2 y A3 también se valoró por transferencia Western usando lisados de células CT26/5T4, que identificó unión fuerte por H8, A1 y A43. Ver Figura 2.

La capacidad de los anticuerpos H8, A1, A2 y A3 para unirse a células que expresan el antígeno 5T4 se valoró usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) de células PC14PE6. Todos los anticuerpos mostraron unión específica a células PC14PE6 que expresan 5T4, sin embargo, el nivel de unión de A2 fue significativamente menor que aquel observado para H8, A1 y A3. Ver Tabla 4.

Tabla 4

Resultados de análisis de FACS

Anticuerpo	Fluorescencia Celular Media
Control (Ab secundario)	4
Control (IgG murina)	4
H8	24
A1	18
A2	7
A3	27

Para evaluar la variabilidad potencial en la producción del anticuerpo, se probaron dos preparaciones independientes de A1 y H8. La unión y las propiedades cinéticas de cada anticuerpo, en comparación a cada 5 preparación, no fue significativamente diferente. Ver Figuras 3A-3B.

Ejemplo 3

Internalización de Anticuerpos Murinos Anti-5T4 por Células 10 que Expresan 5T4

Para valorar la internalización de anticuerpos en la unión al antígeno 5T4, se determinó la cantidad de anticuerpos H8 y A1 detectados en la superficie celular versus en el sobrenadante, como una función del tiempo. Las células 15 MDAMB435/5T4 no enzimáticamente disociadas (células cancerígenas de mama humano) se expusieron a anticuerpos anti-5T4 durante 1 hora a 4°C. Las células se lavaron y se incubaron en el medio a 37°C durante 4 horas a 24 horas. Se determinó la cantidad de anticuerpo unido a membranas 20 celulares versus anticuerpo no unido (es decir, presencia en el sobrenadante) usando FACS. La desaparición de los anticuerpos 5T4 de la superficie de células MDAMB435/5T4 demuestra la modulación del complejo de antígeno 5T4/anticuerpo en la superficie celular, que puede indicar la 25 internalización y/o disociación. Ver Figuras 4A-4C.

Ejemplo 4

Correlación de Epítomos Usando Quimeras de 5T4

Para identificar los epítomos a los cuales se unen cada uno de los anticuerpos A1, A2, A3 y H8, se realizaron ensayos de ELISA usando (1) construcciones Fc de ectodominio de 5T4 con secuencias suprimidas o mutadas, y (2) construcciones de quimeras de 5T4 expresadas de manera transciente en células COS-1. El ectodominio incluye la región amino-terminal, dos repeticiones de alto contenido de leucina, y la región hidrófila de intervención. Las proteínas de fusión que contienen un ectodominio de 5T4 y regiones constantes de Fc de IgG1 humanas se prepararon usando 5T4 de ratón (aminoácidos 1-361), 5T4 de rata (aminoácidos 1-361). 5T4 de cynomologus (aminoácidos 1-355), 5T4 de chimpancé (aminoácidos 1-355), mono titi de cola negra (aminoácidos 1-355). Las construcciones de quimera de 5T4 se representan en la Figura 5. Los resultados de la unión se resumen en la Tabla 5, que indica unión específica, unión parcial, o carencia de unión, por cada uno de los anticuerpos H8, A1, A2 y A3. Los anticuerpos H8 humanizados y A1, A2, A3 quiméricos mostraron propiedades de unión similares a H8, A1, A2 y A3 murinos, respectivamente.

En base a estos resultados, se determinó que el anticuerpo H₈ humanizado se une a 5T4 humano entre los residuos 172 y 252. H8 humanizado se une a 5T4 con o sin

glicosilación N-enlazada en el residuo 344, que confirma que la unión de H8 humanizado a 5T4 humano no está próxima a la membrana. El anticuerpo A1 tiene un primer contacto con 5T4 humano entre los residuos 173 y 252 y un segundo contacto con 5T4 humano entre los residuos 282 y 361. El anticuerpo A2 se une a 5T4 humano entre los residuos 282 y 361. El anticuerpo A3 se une a la primera región de repetición de alto contenido de leucina de 5T4 humano entre los residuos 83 hasta 163. Los epítomos unidos por cada anticuerpo se representan en la Figura 7.

Tabla 5
Resultados de correlación de Epítomos Usando Fusiones de Fc de Ectodominio de 5T4 y Quimeras de 5T4 de Humano/Ratón

Construcción de antígeno	Anticuerpo			
	H8+	A1	A2	A3
5T4				
Fc ectodominio de 5T4 humano	+	+	+	+
Fc ectodominio de 5T4 de ratón	-	-	-	-
Fc ectodominio de 5T4 de rata	-	+/-	-	-
Fc ectodominio de 5T4 de mono cynomologus	-	+	+	+

5

10

15

20

25

Construcción de antígeno 5T4	Anticuerpo			
	H8+	A1	A2	A3
Fc ectodominio de 5T4 de chimpancé	+	+	+	+
Fc ectodominio de 5T4 de mono titi de cola negra	+/-	+	+	-
83-163 de humano/ratón	+	+	+	-
173-361 de humano/ratón	-	-	-	+
173-258 de humano/ratón	-	+/-	+	+
282-361 de humano/ratón (con o sin N-enlace en la posición 344)	+	+/-	-	+

(+) unión; (-) ninguna unión; (+/-) unión parcial

En base a la diferente unión observada a los ectodominios de 5T4 de humano y mono cynomologus, se elaboraron mutaciones dirigidas para distinguir los residuos que participan en la unión al anticuerpo. La unión del anticuerpo H8 humanizado se valoró a cada uno de los ectodominios de 5T4 mutado señalada en la Tabla 6 posterior. Es decir, ectodominios de 5T4 humano que incluyen un residuo de mono cynomologus en la posición indicada. Estos resultados mostraron que los residuos 213 y 214 del antígeno 5T4 humano, se requirieron por el epítipo unido por H8 humanizado.

Tabla 6
Resultados de Correlación de Epítomos Usando Fusión de
Ectodominio de 5T4 Humano/Fc con Mutaciones Dirigidas

	Mutación	Unión de H8 humanizado
5	E189K	+
	V200K	+
	L204V	+
	R213H	+/-
	R213H y R214L	-

10 (+) unión; (-) ninguna unión; (+/-) unión parcial

Además de los ensayos de unión directa, se realizaron ensayos de unión competitiva usando el anticuerpo H8 humanizado biotinilado y cada uno de los anticuerpos A1, A2 ó A3. No se observó la inhibición de la unión a 5T4 humano, dando soporte que cada uno de A1, A2 y A3 se une a un epítopo de 5T4 que es distinto de aquel unido por el anticuerpo H8. Ver Figuras 6A-6B.

20

Ejemplo 5
Correlación de Epítomos Usando BIAcore^{MR}

La correlación de epítomos de los anticuerpos H8, A1, A2 y A3 también se realizó usando BIAcore^{MR} usando un chip CM5 con antígeno 5T4 humano unido. El

25

chip se saturó con anticuerpo H8, A1, A2 ó A3, y se le dio una primera respuesta. El chip entonces se saturó con un segundo anticuerpo de entre los anticuerpos H8, A1, A2 y A3, y se midió una segunda respuesta. Para 5 múltiples experimentos, el chip se regeneró por disociación de los anticuerpos unidos en glicina 10 mM, pH 1.5, seguido por un lavado de amortiguador. Los resultados se resumen en la Tabla 7 posterior. Los porcentajes mostrados son las unidades de respuesta 10 medidas en la unión por un segundo anticuerpo directamente al chip CM5 divididos por las unidades de respuesta medidas en la unión del segundo anticuerpo a un chip CM5 saturado por un primer anticuerpo. Estos resultados muestran que H8, A1, A2 y A3 se unen cada 15 uno a un epítipo distinto en 5T4 humano. Los epítipos unidos por los anticuerpos H8 y A3 están estéricamente cercanos entre sí tal que se disminuye la constante de asociación con el antígeno cuando la unión de H8 se valora en la presencia de A3, y viceversa. Se obtienen 20 resultados similares usando los anticuerpos H8, A1, A2 y A3 quiméricos y humanizados, que se prepararon como se describe en el Ejemplo 7 más adelante en la presente. Ver Tabla 8

200

Tabla 7
Resultados de Ensayo de Competición Usando BIACORE^{MR}--
Porcentaje de Respuestas de Segundo Anticuerpo Después de
Saturación con Primer Anticuerpo

5

2do anticuerpo	1 ^{er} anticuerpo			
	H8	A1	A2	A3
H8	----	114 %	102 %	85 %
A1	109 %	----	109 %	98 %
A2	99 %	98 %	----	94 %
A3	73 %	104 %	106 %	----

10

Tabla 8
Resultados de Ensayos de Competición usando BIACORE^{MR} --
Porcentaje de Segundo Anticuerpo Unido Después de Saturación
con Primer Anticuerpo

15

Segundo anticuerpo/primer anticuerpo unido	tiempo después de inyección del segundo anticuerpo (segundos)					
	19	37.5	75	150	300	600
H8 humanizado/ A3 quimérico	44.9 %	57.0 %	69.1 %	79.4 %	86.6 %	91.3 %
A3 quimérico/ H8 humanizado	46.2 %	51.2 %	58.4 %	67.5 %	76.2 %	83.6 %
A2 quimérico/ A1 quimérico	102.9 %	93.5 %	90.1 %	89.0 %	88.9 %	89.1 %
A1 quimérico/ A2 quimérico	92.5 %	90.6 %	91.4 %	92.7 %	93.9 %	95.5 %

20

25

5

10

15

Segundo anticuerpo/primer anticuerpo unido	tiempo después de inyección del segundo anticuerpo (segundos)					
	19	37.5	75	150	300	600
A3 quimérico/A1 quimérico	82.1 %	82.0 %	84.5 %	87.8 %	90.8 %	92.8 %
A1 quimérico/A3 quimérico	98.8 %	96.5 %	97.0 %	98.0 %	98.8 %	99.6 %
A3 quimérico/A2 quimérico	92.2 %	88.6 %	89.5 %	91.5 %	93.4 %	94.6 %
A2 quimérico/A3 quimérico	89.2 %	88.4 %	89.8 %	91.5 %	92.9 %	94.3 %
H8 humanizado/A1 quimérico	93.2 %	92.7 %	94.2 %	95.9 %	96.9 %	97.3 %
A1 quimérico/H8 humanizado	92.7 %	92.4 %	93.8 %	95.8 %	97.3 %	98.7 %
H8 humanizado/A2 quimérico	93.8 %	94.0 %	96.0 %	98.1 %	99.8 %	101.3 %
A2 quimérico/H8 humanizado	86.9 %	84.7 %	86.9 %	90.5 %	93.7 %	96.7 %

Los resultados combinados de los estudios de correlación de epítomos como se determina usando las construcciones quiméricas (ver Ejemplo 4) y BIACORE^{MR} se presentan en la Figura 7.

Ejemplo 6

Eficiencia de conjugados de Anti-5T4/Caliqueamicina

25

Se usó tinción de tinte vital (MTS) para determinar

el número de células sobrevivientes después de exposición a varios tratamientos. Se compró MTS (kit de ensayo de proliferación celular no radioactivo) de Promega (Madison, Wisconsin) y se usó de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para cada línea celular, se estableció una curva de calibración (número celular versus densidad óptica después de 2 horas) para estimar una densidad inicial apropiada de sembrado. Las células entonces se sembraron en cajas de 96 multiconcavidades a una densidad de 750 a 5,000 células por concavidad. Inmediatamente después del sembrado, las células se expusieron a varias concentraciones (0, 0.01, 0.05, 0.1, 10, 100 y 500 ng de equivalentes de caliqueamicina/ml) de caliqueamicina, CMA-676 y conjugados de caliqueamicina de anticuerpos anti-5T4. Después de la determinación del número de células que sobreviven 96 horas de exposición al fármaco, se calculó la ED_{50} en base a los parámetros de regresión logística derivados de las curvas de dosis-respuesta. La ED_{50} se definió como la concentración de fármaco (CalichDMH) que provocó una reducción al 50 % del número celular después de 96 horas de exposición al fármaco. Un equivalente de caliqueamicina (eq. cal.) es la concentración de caliqueamicina dada ya sea como una sustancia pura o como un conjugado. Dependiendo de la cantidad de caliqueamicina unida al anticuerpo (carga de fármaco-anticuerpo), los equivalentes de caliqueamicina que son diferentes pueden indicar diferentes

concentraciones de proteína.

Los resultados de los ensayos de MTS se muestran en la Tabla 9. Los conjugados de anticuerpo/caliqueamicina preparados usando los ensayos A1 y A3 anti-5T4 redujeron sustancialmente la viabilidad de células MDAMB435/5T4. Se calcularon valores de selectividad al comparar la actividad específica del conjugado a la actividad no específica. Es decir, las veces de CalichDMH para las células que expresan 5T4 se dividieron por las veces de los valores de CalichDMN para células que no expresan 5T4. Cuando se usa un anticuerpo no específico, por ejemplo, hp67.6 (CMA-676), las veces de los valores de CalichDMH son aproximadamente las mismas tal que la selectividad es 1.

Tabla 9
Resultados de Ensayos de MTS

Tratamiento	Línea celular	
	MDAMB435/neo ED50 (ng/ml)	MDAMB435/5T4 ED50 (ng/ml)
CalichDMH	3.3 - 5.0	5.0 - 8.0
huH8-ActBut-CalichDMH	0.4 - 0.8	0.08 - 0.1
CMA-676	34 - 60	50-100
A1-ActBut-CalichDMH	22 - 34	0.4 - 0.6
A2-ActBut-CalichDMH	60	40
A3-ActBut-CalichDMH	20 - 20	0.3 - 20

5

10

Tratamiento	Línea celular	
	MDAMB435/neo veces de CalichDMH	MDAMB435/5T4 veces de CalichDMH
CalichDMH	1.0 - 1.0	1.0 - 1.0
huH8-ActBut-CalichDMH	4.0 - 12.5	50 - 100
CMA-676	0.08 - 0.1	0.08 - 0.1
A1-ActBut-CalichDMH	0.14 - 0.15	13 - 13
A2-ActBut-CalichDMH	0.06	0.13
A3-ActBut-CalichDMH	0.17 - 0.25	0.4 - 17

15

20

25

Selectividad: H8=8; hP67.6 =1; A1=93; A3=1.6

CalichDMH, caliqueamicina no conjugada

huH8-AcBut-CalichDMH, anticuerpo H8 humanizado conjugado a caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut)

CMA-676, conjugado de anti-CD33/caliqueamicina

A1-AcBut-CalichDMH, anticuerpo A1 conjugado a caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut)

A2-AcBut-CalichDMH, anticuerpo A2 conjugado a caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico (AcBut)

A3-AcBut-CalichDMH, anticuerpo A3 conjugado a caliqueamicina usando ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanoico

(AcBut)

La citotoxicidad de los conjugados de anti-5T4/caliqueamicina también se valoró usando un cultivo de células esferoides, tridimensional, que se aproxima más cercanamente a un ambiente celular *in vivo*. Los esferoides se elaboraron esencialmente de acuerdo a Yuhas et al., (1977) Cancer Res. 37:3639-3643. De forma breve, se sembraron 10⁵ células en 5 ml de medio de cultivo en cajas de cultivo celular de poliestireno de 60 mm anteriormente revestidas con 5 ml de agar grado cultivo de tejido a 0.65 % en medio de cultivo (Sigma of St. Louis, Missouri). Las cajas se incubaron durante 5-6 días a 37°C en CO₂ al 5 % en aire. Los esferoides con un diámetro de 0.2 mm se seleccionaron y colocaron en una caja de multiconcavidades de 24 concavidades. Cada concavidad contuvo 0.5 ml de material base de agar, 1 esferoide y 1 ml de revestimiento de medio de cultivo. Los esferoides entonces se expusieron a varias concentraciones (0, 0.091, 0.365, 1.46, 5.86, 23.44, 93.75 y 375 ng de equivalentes de caliqueamicina/ml) de caliqueamicina, CMA-676 y conjugados de anti-5T4/caliqueamicina preparadas usando los anticuerpos A1 y A3 anti-5T4 y un ligador AcBut. Ambos conjugados de anti-5T4/caliqueamicina inhibieron significativamente el crecimiento de las células MDAMB435/5T4. Ver Figura 8.

Ejemplo 7Preparación y Propiedades de Unión de Anticuerpos Anti-5T4
Quiméricos y Humanizados

Se construyeron anticuerpos H8, A1, A2 y A3
5 quiméricos que tienen secuencias de regiones variables de
cadena pesada y cadena ligera H8 murinas y regiones constantes
de cadena pesada IgG4 humana y regiones constantes de cadena
ligera kappa humana. La cisteína presente en la posición 67 de
la región variable de cadena pesada A1 se cambio de manera
10 opcional a fenilalanina, y la cisteína presente en la posición
91 de la región variable de cadena pesada A3 se cambio
opcionalmente a tirosina. Los variantes se exponen en SEQ ID
NO: 2 (A1 VH) y SEQ ID NO: 10 (A3 VH). La presencia o ausencia
de secuencias intrónicas y el reemplazo de residuos de
15 cisteína no afecta la expresión del anticuerpo. Para la
clonación de secuencias que codifican para regiones constantes
de IgG, se suprimieron de manera opcional las secuencias
intrónicas.

Se preparó H8 humanizado como se describe en la
20 Publicación Internacional de PCT No. WO 2006/031653. Se
prepararon anticuerpos A1 humanizados por injerto de CDR como
se describe adicionalmente más adelante en la presente. La CDR
de los anticuerpos A1, A2 y A3 murinos se identificaron usando
la definición de AbM, que se basa en la variabilidad de
25 secuencia así como en la ubicación de las regiones aza

estructurales. En general, se seleccionaron estructuras alternas aceptadoras humanas en base a que son sustancialmente similares a las regiones de estructura alterna de los anticuerpos murinos, o que fueron muy similares a la secuencia de consenso de la subfamilia de regiones variables. También se dio consideración a la representación de los locus de estructura alterna en humanos, tal que se prefirieron en general secuencias ampliamente representadas con respecto a secuencias menos populosas. Se hicieron mutaciones adicionales de las secuencias aceptadoras de estructura alterna humanas para restaurar los residuos murinos que se cree que son comprendidos en los contactos de antígeno y/o los residuos comprendidos en la integridad estructural del sitio de unión a antígeno. La secuencia de aminoácido también se puede optimizar para preferencia de codones de células CHO y para remover sitios de enzimas de restricción. Se puede usar un programa de predicción de estructura de péptido para analizar las secuencias de región pesada y ligera variable humanizadas para identificar y evitar sitios de modificación de proteína post-traduccionales introducidos por el diseño de humanización.

Se construyó una región variable de cadena pesada A1 humanizada (A1 VH versión 1.0) para incluir la CDR de A1 murino injertadas en una región de estructura variable de DP21 humana (subgrupo VH7, Acceso No. CAA43346, SEQ ID NO: 88), que

contiene una mutación (S82A) de estructura alterna y una retromutación (E46K). Se prepararon variantes al remover la retromutación (A1 VH versión 1.1 y 1.2). Una segunda región variable de cadena pesada A1 humanizada se preparó al injertar CDR de A1 en la región de estructura alterna de línea germinal DP-54 humana (A1 VH versión 2.0). Se hicieron seis (6) retromutaciones para producir A1 VH versión 2.1. Como se describe adicionalmente más adelante, ambas regiones variables de cadena pesada A1 no retuvieron propiedades de unión a 5T4.

Las regiones de estructura alterna DP-21 y DP-54 muestran 63 % de identidad de secuencia de aminoácidos sobre su longitud, indicando que se pueden hacer numerosos cambios de aminoácidos en tanto que se conserva la especificidad de unión del anticuerpo, incluyendo la capacidad para unirse a un epítipo particular. La similitud de las regiones variables de cadena pesada A1 humanizadas se muestra en la Tabla 10. Las secuencias de nucleótidos representativas que codifican para las regiones variables de cadena pesada A1 humanizada se exponen como SEQ ID Nos: 48, 50, 53 y 55. Las secuencias de aminoácidos representativas de las regiones variables de cadena pesada A1 humanizadas se exponen como SEQ ID Nos: 49, 51, 52, 54 y 56. Ver también Figuras 9A-9B

Una región variable de cadena ligera A1 humanizada se construyó para incluir la CDR de A1 murino injertadas en las regiones de estructura alterna de línea germinal de DPK24

humano (subgrupo VKIV), DPK9 (subgrupo VKI), y DPC23 (subgrupo VKIII). Después de la incorporación de una retromutación de S67Y en la región variable de cadena ligera A1 humanizada, las estructuras alternas preparadas con cada una de estas 5 estructuras alternas se mostraron unión a 5T4. Ver más adelante, incluyendo Tabla 13. La región de estructura alterna de DPK24 muestra 74 % y 73 % de identidad de secuencia de aminoácidos sobre su longitud a DPK9 y DPK23, respectivamente. La región de estructura alterna de DPK9 muestra 74 % de 10 identidad de secuencia de aminoácidos sobre su longitud a DPK23. La similitud de las regiones variables de cadena ligera A1 humanizadas se muestra en la Tabla 10. Las múltiples versiones de las regiones de estructura alterna, variables de cadena ligera humanizadas demuestran que se pueden hacer 15 numerosos cambios de aminoácido en tanto que se conserva la especificidad de unión del anticuerpo, incluyendo la capacidad para unirse a un epítipo particular. Las secuencias de nucleótidos representativas que codifican a las regiones variables de cadena ligera A1 humanizadas se exponen como SEQ 20 ID Nos: 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73 y 75. Las secuencias de aminoácidos representativas de las regiones variables de cadena ligera A1 humanizadas se exponen como SEQ ID Nos: 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74 y 76. Ver también Figuras 9C-9F.

Tabla 10
Relación de Anticuerpos A1 Humanizados

	1 ^{ra} Región Variable/2 ^{da} Región Variable	Porcentaje de Identidad
5	HuA1 VL v1.1 (SEQ ID NO:60)/ HuA1 VL v2.4, proteína (SEQ ID NO: 70)	86 %
	HuA1 VL v1.1 (SEQ ID NO:60)/ HuA1 VL v3.1, proteína (SEQ ID NO: 75)	86 %
10	HuA1 VL v2.4 (SEQ ID NO:70)/ HuA1 VL v3.1, proteína (SEQ ID NO: 75)	85 %
	HuA1 VL v1.1 (SEQ ID NO:52)/ HuA1 VL v2.0, proteína (SEQ ID NO: 54)	78 %

Los anticuerpos humanizados A2 y A3 se diseñaron
15 usando una estrategia similar. Las secuencias de aminoácidos
representativas de las regiones variables de cadena pesada A2
humanizadas y regiones variables de cadena ligera A2
humanizadas se exponen como SEQ ID Nos; 77-78 y SEQ ID Nos:
79-80, respectivamente. Ver también, Figura 9G. Las secuencias
20 de aminoácidos representativas de las regiones variables de
cadena pesada A3 humanizadas y las regiones variables de
cadena ligera A3 humanizadas se exponen como SEQ ID Nos: 81-82
y SEQ ID Nos: 83-84, respectivamente. Ver también Figura 9H.

Para valorar la novedad de las regiones variables de
25 cadena pesada y ligera A1, A2 y A3 humanizadas, se realizó

análisis BLASTn y BLASTp como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11

5 Análisis BLASTn y BLASTp

10

15

20

25

Secuencia de búsqueda	Identidad (%) de Secuencia Sujeto más Cercana	Descripción de Secuencia Sujeto más cercana
ADN de A1 VL humanizado, versión 1.1 (SEQ ID No:59)	83%	Definición.- ARNm parcial de homo sapiens para región variable de cadena kappa de inmunoglobulina (gen IGKV2) Acceso AM040532
Proteína de A1 VL humanizada, versión 1.1 (SEQ ID No:60)	82%	Definición.- Precursor de región B17 de cadena kappa V-IV de Ig. Acceso P06314
ADN de A1 VL humanizado, versión 2.4 (SEQ ID No:69)	85%*	Definición.- ARNm de región variable de cadena ligera de inmunoglobulina anti-virus de rabia de clon SC4064 de homo sapiens, cds completo. Acceso AY942044
Proteína de A1 VL humanizada, versión 2.4. (SEQ ID No:70)	92%	Definición.- Región de cadena kappa V de inmunoglobulina humanizada anti-integrina alfa 4. Acceso AAA62146
ADN de A1 VL humanizado, versión 3.1 (SEQ ID No:75)	84%*	Definición.- ARNm de región variable de cadena ligera (IGL@) de inmunoglobulina anti-toxoide de tétano de clon 136e06 de homo sapiens, cds parcial. Acceso AY867377

5

10

15

20

25

Secuencia de búsqueda	Identidad (%) de Secuencia Sujeto más Cercana	Descripción de Secuencia Sujeto más cercana
Proteína de A1 VL humanizada, versión 3.1 (SEQ ID No:76)	84%	Definición.- Anticuerpo anti-scFv de Burkholderia mallei [construcción sintética] Acceso ABI97018
ADN de A1 VH, humanizado, versión 1.1 (SEQ ID No:50)	88%*	Definición.- ARNm de región variable de cadena pesada de IgA de ID:CLL097 de homo sapiens, cds parcial. Acceso AF021940
Proteína de A1 VH humanizada, versión 1.1 (SEQ ID No:51)	90%	Definición.- Región variable de cadena pesada de IgA [homo sapiens] Acceso AAC09074
ADN de A1 VH humanizado, versión 2.0 (SEQ ID No:53)	81%*	Definición.- ARNm de región variable de cadena pesada (IGH) de inmunoglobulina de clon 23u-45 de homo sapiens, cds parcial. Acceso AF062241
Proteína de A1 VH humanizada, versión 2.0 (SEQ ID No:54)	77%	Definición.- Cadena D, conocimiento en la señalización Erbb de la estructura del complejo Erbb2-Pertuzumab. Acceso 1S78_D
Proteína de A2 VL humanizada, versión 1.0 (SEQ ID No:79)	87%	Definición.- Cadena A, estructura cristalina del fragmento Fab de una aglutinina fría de Igm monoclonal humana. Acceso 1QLR_A
Proteína de A2 VL humanizada, versión 2.0 (SEQ ID No:80)	83%	Definición.- Cadena ligera de inmunoglobulina kappa 1 [homo sapiens]. Acceso AAD29608

5

10

15

20

25

Secuencia de búsqueda	Identidad (%) de Secuencia Sujeto más Cercana	Descripción de Secuencia Sujeto más cercana
Proteína de A2 VH humanizada, versión 1.0 (SEQ ID No:77)	88%	Definición.- Cadena A, estructura cristalina de un anticuerpo humanizado Fv 528. Acceso 1WT5_A
Proteína de A2 VH humanizada, versión 2.0 (SEQ ID No:78)	78%	Definición.- Cadena D, conocimientos en señalización de Erbb de la estructura del complejo Erbb2-Pertuzumab. Acceso 1S78_D
Proteína de A3 VL humanizada, versión 1.0 (SEQ ID No:83)	85%	Definición.- Región VLJ de cadena ligera kappa de inmunoglobulina [homo sapiens]. Acceso BAC01708
Proteína de A3 VL humanizada, versión 2.0 (SEQ ID No:84)	90%	Definición.- HerMel [producto sintético] Acceso CAL47329
Proteína de A3 VH humanizada, versión 1.0 (SEQ ID No:81)	79%	Definición.- Proteína de Igh-1a [Mus mmusculus] Acceso AAH80671
Proteína de A3 VH humanizada, versión 2.0 (SEQ ID No:82)	77%	Definición.- Proteína Igh-1a [Mus musculus] Acceso AAH80671

* Cuando cobertura de búsqueda = 100%

Las Figuras 10A-10B muestran secuencias de región variable de cadena pesada, adicionales, que se pueden usar como estructuras alternas para la preparación de anticuerpos A1, A2 y A3 anti-5T4 humanizados. Las Figuras 11-13 muestran secuencias adicionales de región variable de cadena ligera que

se pueden usar como una estructura alterna para la preparación de anticuerpos A1, A2 y A3 anti-5T4, humanizados, la Figura 14 muestra regiones constantes representativas que se pueden usar para la preparación de anticuerpos A1, A2 y A3 anti-5T4 humanizados.

Para valorar la unión específica y la afinidad de los anticuerpos H8, A1, A2 y A3 quiméricos y humanizados, se realizó el análisis BIACORE^{MR} usando el antígeno 5T4 humano inmovilizado en un chip CM5. Ver Ejemplo 2. Los resultados para los anticuerpos A1, A2 y A3 quiméricos se muestran en la Tabla 12 a continuación.

Tabla 12

Resultados del ensayo BIACORE^{MR}

Anticuerpo	KD(M)	KA(1/M)	Kd(1/s)	Ka (1/Ms)
H8 humanizado	1.5X10 ⁻¹⁰	6.5X10 ⁹	4.0X10 ⁻⁵	2.6X10 ⁵
A1 quimérico	4.4X10 ⁻¹⁰	2.3X10 ⁹	6.7X10 ⁻⁵	1.5X10 ⁵
A2 quimérico	1.8X10 ⁻⁹	5.7X10 ⁸	2.5X10 ⁻⁴	1.4X10 ⁵
A3 quimérico	~1.8X10 ⁻¹⁰	~5.4X10 ⁹	~1.0X10 ⁻⁵	~5.4X10 ⁴
A1 quimérico + C67F	3.8X10 ⁻¹⁰	2.6X10 ⁹	6.3X10 ⁻⁵	1.7X10 ⁵
A3 quimérico +C91Y	5.9X10 ⁻⁹	1.7X10 ⁹	1.6X10 ⁻⁵	2.7X10 ⁴

En general, la quimerización/humanización

incrementó la afinidad de H8, A1, A2 y A3 a 5T4 humano. Comparar Tabla 3. El incremento en las afinidades de unión parece resultar principalmente de una más lenta disociación del anticuerpo y antígeno en lugar de una disociación más rápida. Los anticuerpos A2 y A3 quiméricos mostraron las propiedades de unión mejoradas después de la quimerización.

Todas las regiones variables de cadena pesada A1 humanizadas retuvieron propiedades de unión a 5T4. Además, la remoción de la retromutación de K46 de la región variable de cadena pesada A1 humanizada no afecta las propiedades de unión de 5T4. Las regiones variables de cadena ligera A1 humanizadas mostraron propiedades comprometidas de unión a 5T4. Las regiones variables de cadena ligera A1 humanizadas construidas usando las estructuras alternas DPK9 y DPK23 se unieron a 5T4 con mayor afinidad que las regiones variables de cadena ligera A1 humanizadas construidas usando las estructuras alternas DPK24. Se incorporaron retromutaciones para restaurar y/o optimizar la unión a 5T4. El reemplazo del residuo de serina en la posición 67 con un residuo de tirosina, como se ve en la región estructural alterna A1 murina, restauró completamente las propiedades de unión al antígeno 5T4. Ver Tabla 13.

Tabla 13

Inhibición de la unión del anticuerpo A1 quiméricos

biotinilado a 5T4 humano por ELISA

	Anticuerpo Versión A1	IC ₅₀
5	A1 quimérico	16-20 nM
	huA1 V _H v2.0+huA1 V _L v1.1	>1 µM
	huA1 V _H v2.0+huA1 V _L v1.1	28 nM
	huA1 V _H v2.0+huA1 V _L v2.0	>1 µM
	huA1 V _H v2.0+huA1 V _L v2.4	16 nM
10	huA1 V _H v2.0+huA1 V _L v3.0	>1 µM
	huA1 V _H v2.0+huA1 V _L v3.1	27 nM

huA1, A1 humanizado

v, versión

15 Ejemplo 8

Reactividad cruzada de especies de anticuerpos anti-5T4

La reactividad de especie cruzada de los anticuerpos anti-5T4 descritos en la presente se valoró para determinar las especies pertinentes para estudios de eficiencia *in vivo* y análisis de toxicidad. También se usó la correlación de la actividad de unión y la relación de los diferentes ectodominios de 5T4 para describir adicionalmente el epítopo unido por cada anticuerpo. Se realizaron ensayos de unión usando los ectodominios de 5T4 de varias especies fusionadas a

Fc de IgG1 humana. El porcentaje de identidad de cada región de ectodominio a 5T4 humano se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14

5 Relación de 5T4 de diferentes especies

10

15

20

Especies	Por ciento de identidad a 5T4 humano	Aminoácidos de ectodominio
Humano	100	1-355
Ratón	84.0	1-361 ^a
Rata	83.1	1-361 ^a
Chimpancé (Secuencia parcial, 396/420 aminoácidos)	~99.5	1-355
Mono cynomologus	96.7	1-355
Mono tití cola negra (secuencia parcial, 377/420 aminoácidos)	~94.6	1-355
Perro	87.9	1-355
Vaca	86.9	1-355

^a Contiene 6 repeticiones directas de aminoácidos dentro del dominio hidrófilo.

25

Las secuencias de longitud completa o parciales de 5T4 de humano, ratón, rata, perro y vaca se han descrito anteriormente como acceso de GenBank números Z29083 (humano, SEQ ID No:87), AJ012160 (ratón), BC087011 (rata), XM539020

(perro), y XM593502 (vaca). Se generó una secuencia parcial virtual de 5T4 de chimpancé usando una alineación del ARNm y secuencias genómicas. Se aislaron los ácidos nucleicos que codifican para las proteínas 5T4 de mono cynomologus y mono
 5 tití de cola negra. La secuencia de aminoácidos de éstos antígenos 5T4 adicionales se muestran en la Figura 15 y también se exponen como SEQ ID No:86 (mono cynomologus) y SEQ ID No:85 (mono tití de cola negra).

Para valorar la novedad de las secuencias de mono
 10 cinomolougus y de mono tití de cola negra, se realizaron análisis BLAST como se describe en el Ejemplo 2. Cuando se usa la secuencia de aminoácidos de 5T4 de mono tití de cola negra de longitud completa como una secuencia de búsqueda, la secuencia sujeta más cercana se identificó como 5T4 humano
 15 (acceso de GenBank número NP_006661.1), con 94% de identidad (302/320 aminoácidos). Las secuencias también difirieron en el término carboxilo, con los aminoácidos 1-19 de SEQ ID No:85 que no se alinea con la secuencia en sujeta más cercana. Cuando se usa la secuencia de aminoácidos de 5T4 de mono
 20 cinomolougus de longitud completa como una secuencia de búsqueda, la secuencia sujeta no virtual más cercana se identificó como un precursor de glicoproteína de tropoblasto también de mono cinomolougus (acceso GenBank número BAE00432.1), con 99% de identidad (364/366 aminoácidos). Las
 25 secuencias también difirieron en el término carboxilo, con los

aminoácidos 1-25 de SEQ ID No:86 que no se alinean con la secuencia sujeto no virtual más cercana.

Para valorar unión de los anticuerpos anti-5T4, las proteínas de fusión de ectodominio/Fc de 5T4 se transfectaron de manera transiente en células COS-1, y se realizaron ensayos de ELISA. Se usaron como controles anticuerpos de IgG4 e IgG1 humanos no pertinentes. La reactividad de especie cruzada de los anticuerpos anti-5T4 se resume en la Tabla 15.

10 Tabla 15

Reactividad cruzada de anticuerpos anti-5T4 (ED50 en nM)

		huH8 ?4	huH8 ?1	ChiA1 ?4	ChiA2 ?4	ChiA3 ?4
	Humano	0.19	0.20	0.28	0.21	0.20
	Chimpancé	0.19	0.22	0.27	0.22	0.20
15	Mono tití de cola negra	+/-	+/-	0.24	0.22	-
	Mono cynomologus	-	-	0.18	0.18	0.23
	Rata	-	-	+/-	-	-
20	Ratón	-	-	-	-	-

huH8 ?4, anticuerpo H8 humanizado que tiene regiones constantes de IgG4.

huH8 ?1, anticuerpo H8 humanizado que tiene regiones constantes de IgG1.

ChiA1 ?4, anticuerpo A1 quiméricos que tiene regiones
constantes de IgG4.

ChiA2 ?4, anticuerpo A2 quimérico que tiene regiones
constantes IgG4.

5 ChiA3 ?4, anticuerpo A3 quimérico que tiene regiones
constantes de IgG4.

(+/-), unión parcial.

(-), no unión.

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que se une específicamente al antígeno 5T4 humano, caracterizado porque:

5 (a) comprende un dominio de unión a antígeno de los anticuerpos A1, A2 o A3 murinos;

(b) compete para la unión a 5T4 con los anticuerpos A1, A2 o A3 murinos;

(c) se une al epítipo de 5T4 unido por los
10 anticuerpos A1, A2 o A3; o

(d) comprende un fragmento de unión a 5T4 de un anticuerpo de (a)-(c).

2. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo
15 quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena individual, un fragmento Fab, un fragmento F(ab)₂, un fragmento Fv, un anticuerpo tetramérico, un anticuerpo tetravalente, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo específico de dominio, un anticuerpo de dominio individual, o
20 una proteína de fusión.

3. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque es un anticuerpo monoclonal murino.

4. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque tiene una afinidad de unión para el
25 antígeno 5T4 humano de al menos aproximadamente 1×10^{-7} M a

aproximadamente 1×10^{-12} M.

5. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque selecciona específicamente como objetivo células que expresan 5T4 *in vivo*.

5 6. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos de los residuos 20-138 de SEQ ID No:2, los residuos 19-135 de SEQ ID No:6, los residuos 20-141 de SEQ ID No:10, los residuos 1-119 de SEQ ID
10 No:49; o los residuos de la región variable de cadena pesada A1, A2 o A3 humanizada.

7. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de los residuos 21-127
15 de SEQ ID No:4, los residuos 23-130 de SEQ ID No:8, los residuos 21-127 de SEQ ID No:12; o los residuos de una región variable de cadena ligera A1, A2 o A3 humanizada.

8. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la región variable de cadena pesada
20 comprende una secuencia de aminoácidos y los residuos 20-138 de SEQ ID No:2, y en donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos de los residuos 21-127 de SEQ ID No:4.

9. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación
25 1, caracterizado porque la región variable de cadena pesada

comprende una secuencia de aminoácidos derivada de los residuos 19-135 de SEQ ID No:6, y en donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos derivada de los residuos 23-130 de SEQ ID No:8.

5 10. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la región variable de cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos derivada de los residuos 20-141 de SEQ ID No:10, y en donde la región variable de cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos
10 derivada de los residuos 21-127 de SEQ ID No:12.

11. Anticuerpo de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque es un anticuerpo anti-5T4 humanizado o quimérico.

12. Anticuerpo quimérico humanizado de conformidad
15 con la reivindicación 11, caracterizado porque comprende regiones constantes derivadas de regiones constantes humanas.

13. Anticuerpo quimérico humanizado de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la región constante de cadena ligera humana se deriva de la región
20 constante de cadena ligera kappa humana.

14. Anticuerpo quimérico humanizado o fragmento de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la región constante de cadena pesada humana se deriva de una región constante de cadena pesada de
25 IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana.

15. Anticuerpo quimérico humanizado o fragmento de anticuerpo de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque la región constante de cadena pesada de IgG4 humana comprende prolina en la posición 241.

5 16. Anticuerpo quimérico humanizado de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la región variable de al menos una cadena ligera o al menos una cadena pesada comprende:

(a) regiones de estructura alterna que comprenden
10 residuos de una región de estructura alterna de anticuerpo humano; y

(b) una o más CDR de la región variable de cadena ligera de SEQ ID No:4, 8 o 12, o una o más CDR de la región variable de cadena pesada de SEQ ID No:2, 6 o 10.

15 17. Anticuerpo quimérico o humanizado de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque los residuos humanos son residuos de estructuras alternas humanas seleccionados del grupo que consiste de:

(a) un región de estructura alterna de cadena pesada
20 de anticuerpo humano seleccionada del grupo que consiste de DP-21 (VH7), DP-54 (VH3-07), DP-47 (VH3-23), DP-53 (VH-74), DP-49 (VH3-30), DP-48 (VH3-13), 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-
25 10, DA-6 y YAC-7 (VH1-69), DP-88 (VH1-e), DP-3 y DA-8 (VH1-f);

(b) una región de estructura alterna de cadena ligera de anticuerpo humano de un clon de línea germinal del subgrupo IV de DPK24, un subgrupo V?III (DPK23, DPK22, DPK20, DPK21); o un clon de línea germinal del subgrupo V?I (DPK9, DPK1, O2, DPK-7);

(c) una secuencia de consenso de una región de estructura alterna de cadena pesada de (a); o

(d) una región de estructura alterna que es al menos 63% idéntica a una región de estructura alterna de (a)-(c).

10 18. Anticuerpo quimérico humanizado de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque comprende al menos dos CDR de cualquiera de las SEQ ID Nos:2, 4, 6, 8, 10 o 12.

15 19. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la cadena ligera comprende una región variable que comprende al menos dos de tres CDR de cualquiera de SEQ ID Nos:4, 8 o 12.

20 20. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque la cadena ligera comprende una región variable que comprende tres CDR de cualquiera de las SEQ ID Nos:4, 8 o 12.

25 21. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la cadena pesada comprende una región variable que comprende al menos dos de tres CDR de cualquiera de SEQ ID Nos:2, 6 o 10.

22. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 21, caracterizado porque la cadena pesada comprende una región variable que comprende tres CDR de cualquiera de SEQ ID Nos:2, 6 o 10.

5 23. Anticuerpo humanizado de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque comprende las CDR de SEQ ID No:2 y 4, las CDR de SEQ ID No:6 y 8, o las CDR de SEQ ID No:10 y 12.

24. Anticuerpo quimérico o humanizado de conformidad
10 con la reivindicación 11, caracterizado porque la secuencia de región variable de cadena pesada comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos de los residuos 20-138 de SEQ ID No:2;

(b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%
15 idéntica a los residuos 20-138 de SEQ ID No:2;

(c) una secuencia de aminoácidos de los residuos 19-135 de SEQ ID No:6;

(d) una secuencia de aminoácidos que es al menos
86% idéntica a los residuos 19-135 de SEQ ID No:6;

(e) una secuencia de aminoácidos de los residuos 20-141 de SEQ ID No:10;

(f) una secuencia de aminoácidos que es al menos 91% idéntica a los residuos 20-141 de SEQ ID No:10;

(g) una secuencia de aminoácidos de cualquiera de
25 SEQ ID Nos:49, 51, 52, 54, 56, 77, 78, 81 u 82;

(h) una secuencia de aminoácidos que es al menos 91% idéntica a SEQ ID No:51;

(i) una secuencia de aminoácidos que es al menos 78% idéntica a SEQ ID No:54;

5 (j) una secuencia de aminoácidos que es al menos 89% idéntica a SEQ ID No:77;

(k) una secuencia de aminoácidos que es al menos 79% idéntica a SEQ ID No:78;

(l) una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%
10 idéntica a SEQ ID No:81; o

(m) una secuencia de aminoácidos que es al menos 78% idéntica a SEQ ID No:82.

25. Anticuerpo quimérico o humanizado de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado porque la secuencia de
15 región variable de cadena ligera comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos de los residuos 21-127 de SEQ ID No:4;

(b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 94% idéntica a los residuos 21-127 de SEQ ID No:4;

20 (c) una secuencia de aminoácidos de los residuos 23-130 de SEQ ID No:8;

(d) una secuencia de aminoácidos que es al menos 96% idéntica a los residuos 23-130 de SEQ ID No:8;

(e) una secuencia de aminoácidos de los residuos 21-
25 127 de SEQ ID No:12;

(f) una secuencia de aminoácidos que es al menos 98% idéntica a los residuos 21-127 de SEQ ID No:12;

(g) una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID Nos:58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 79, 80,
5 83 u 84;

(h) una secuencia de aminoácidos que es al menos 83% idéntica a SEQ ID No:60;

(i) una secuencia de aminoácidos que es al menos 93% idéntica a SEQ ID No:70

10 (j) una secuencia de aminoácidos que es al menos 85% idéntica a SEQ ID No:76;

(k) una secuencia de aminoácidos que es al menos 85% idéntica a SEQ ID No:76;

15 (l) una secuencia de aminoácidos que es al menos 88% idéntica a SEQ ID No:79;

(m) una secuencia de aminoácidos que es al menos 84% idéntica a SEQ ID No:80;

(n) una secuencia de aminoácidos que es al menos 90% idéntica a SEQ ID No:83; o

20 (o) una secuencia de aminoácidos que es al menos 91% idéntica a SEQ ID No:84.

26. Conjugado de anticuerpo/fármaco para distribución de fármaco, caracterizado porque comprende:

25 y (a) un anticuerpo de acuerdo a la reivindicación 1;

(b) un fármaco, que está unido directa o indirectamente al anticuerpo.

27. Conjugado de anticuerpo/fármaco de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el fármaco es un agente terapéutico seleccionado del grupo que consiste de una citotoxina, un radioisótopo, un agente inmunomodulador, un agente anti-angiogénico, un agente anti-proliferativo, un agente pro-apoptótico, un agente quimioterapéutico, un ácido nucleico terapéutico.

28. Conjugado de anticuerpo/fármaco de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque el agente terapéutico es una citotoxina.

29. Conjugado de anticuerpo/fármaco de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque la citotoxina es un antibiótico, un inhibidor de polimerización de tubulina, un agente de alquilación, un inhibidor de síntesis de proteína, un inhibidor de proteína-kinasa, un inhibidor de fosfatasa o un inhibidor de topoisomerasa, o una enzima.

30. Conjugado de anticuerpo/fármaco de conformidad con la reivindicación 27, caracterizado porque la citotoxina es un antibiótico.

31. Conjugado de anticuerpo/fármaco de conformidad con la reivindicación 30, caracterizado porque el antibiótico es caliqueamicina.

32. Conjugado de anticuerpo/fármaco de conformidad

con la reivindicación 31, caracterizado porque la caliqueamicina es un análogo de disulfuro o N-acetil-derivado de caliqueamicina.

33. Conjugado de anticuerpo/fármaco de conformidad
5 con la reivindicación 32, caracterizado porque la caliqueamicina es N-acetil-?-caliqueamicina.

34. Conjugado de anticuerpo/fármaco de conformidad con la reivindicación 26, caracterizado porque el fármaco está unido al anticuerpo mediante un ligador.

10 35. Conjugado de anticuerpo/fármaco de conformidad con la reivindicación 34, caracterizado porque el ligador se selecciona del grupo que consiste de ácido 4-(4'-acetilfenoxi)butanóico (AcBut), ácido 3-acetilfenil-acídico (AcPac), ácido 4-mercapto-4-metil-pentanoico (Amida), y
15 derivados de los mismos.

36. Método para distribuir un fármaco a células que expresan 5T4, caracterizado porque comprende poner en contacto las células con un conjugado de anticuerpo/fármaco que comprende (i) un anticuerpo anti-5T4 de la reivindicación 1, y
20 (ii) un fármaco que está unido al anticuerpo anti-5T4 directamente o de manera indirecta.

37. Método de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado porque el fármaco se internaliza en una célula objetivo.

25 38. Método para tratar a un sujeto que tiene un

cáncer positivo a 5T4, caracterizado porque comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un conjugado de anticuerpo anti-5T4/fármaco que comprende (i) un anticuerpo anti-5T4 de la reivindicación 1, y (ii) un agente terapéutico que se une al anticuerpo anti-5T4 de manera directa o indirecta.

39. Método de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado porque el conjugado de anticuerpo anti-5T4/fármaco es un conjugado de anticuerpo anti-5T4/caliqueamicina, y comprende además administrar un segundo agente terapéutico, en donde el conjugado de anti-5T4/caliqueamicina y el segundo agente terapéutico se administran de manera concurrente o consecutiva en cualquier orden.

40. Anticuerpo que se une de manera específica a un epítipo de 5T4 humano, caracterizado porque comprende los residuos 173-252 y 276-355, exceptuando los residuos 213-214 de SEQ ID No:87.

41. Anticuerpo que se une de manera específica a un epítipo de 5T4 humano, caracterizado porque comprende los aminoácidos 276-355 de SEQ ID No:87.

42. Anticuerpo que se une de manera específica a un epítipo de 5T4 humano, caracterizado porque comprende los aminoácidos 83-163 de SEQ ID No:87.

43. Anticuerpo caracterizado porque se une de manera

específica a 5T4 de mono cynomologus que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No:86.

44. Proteína de 5T4, aislada, caracterizada porque comprende:

5 (a) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID No:85 u 86; o

(b) una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a SEQ ID No:85.

45. Anticuerpo, caracterizado porque se une de 10 manera específica a la proteína de 5T4 aislada, de la reivindicación 44.

46. Ácido nucleico aislado que codifica para una región variable de cadena pesada anti-5T4, caracterizado porque comprende:

15 (a) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-414 de SEQ ID No:1;

(b) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 55-405 de SEQ ID No:5;

20 (c) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 58-423 de SEQ ID No:9;

(d) una secuencia de nucleótidos que codifica para cualquiera de SEQ ID Nos:48, 50, 53 o 55;

25 (e) una secuencia de nucleótidos que es al menos 89% idéntica a SEQ ID No:50, cuando la cobertura de búsqueda es 100%;

(f) una secuencia de nucleótidos que es 82% idéntica a SEQ ID No:53, cuando la cobertura de búsqueda es 100%; o

(g) un ácido nucleico que hibridiza de manera específica al complemento de cualquiera de (a)-(d) bajo condiciones de hibridación severa.

47. Ácido nucleico aislado que codifica para una región variable de cadena ligera anti-5T4, caracterizado porque comprende:

(a) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 61-381 de SEQ ID No:3;

(b) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 67-390 de SEQ ID No:7;

(c) una secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 61-381 de SEQ ID No:11;

(d) una secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de cadena ligera A1, A2 o A3 humanizada de cualquiera de las SEQ ID Nos:57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, o 75;

(e) una secuencia de nucleótidos que es 84% idéntica a SEQ ID No:59 cuando la cobertura de búsqueda es 100%;

(f) una secuencia de nucleótidos que es 86% idéntica a SEQ ID No:69 cuando la cobertura de búsqueda es 100%;

(g) una secuencia de nucleótidos que es 85% idéntica a SEQ ID No:75 cuando la cobertura de búsqueda es 100%; o

(h) un ácido nucleico que hibridiza específicamente al complemento de cualquiera de (a)-(d) bajo condiciones de hibridación severa.

239

171

RESUMEN DE LA INVENCION

Anticuerpos anti-5T4, conjugados de anticuerpo anti-5T4/fármaco, y métodos para preparar y usar los mismos.

5

10

15

20

25

FIG. 1A

A1 VH Murina

ATGGATTGGCTGTGGAACTTGCTATTCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTAT
 CCAASACAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTG
 GAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACCTTCACAAAC
 TTTGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGGTCCAGGAGAGGGTTTAAAGTGGAT
 GGGCTGGATAAACAACCAACACTGGAGAGCCCAAGATATGCTGAAGAGTTCA
 AGGGACCGT (G/T) TGCCTTTTCTTTGGAAACCACTGCCAGCACTGCCTATTTC
 CAGATCAACACCTCAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCTGTGCAAG
 AGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTC
 TCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:1)

MDWLNNLLFLMAAAQSIQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTN
PGMNNVKQGPGEGLKWMGWINTNTGEPYAEFEKGR (C/F) AFSLETTASTAYL
QINNLIKNEDETATYFCARDWDGAYFFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:2)

A1 VL Murina

ATGAAGTCACAGACCCAGGTCTTCGTATTCTACTGCTCTGTGTGTCTGG
 TGCTCATGGAGTATTGTGATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCTTGTTC
 CAGCAGGAGACAGGGTGACCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGT
 AATGATGTAGCTTGGTACCAACAGAGCCAGGGCAGTCTCCTAAACTGTT
 GATAAATCTTTGCAACCAATCGCTACACTGGAGTCCCTAATCGCTTCACTG
 GCAGTGGATATGGGACGGATTTCACTTTCACCATCAGCACTGTGCAGGCT
 GAAGACCTGGCACTTTATTTCTGTGAGCAGGATTATAGCTCTCCGTGGAC
 GTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:3)

MKSOTQVFFVLLLCVSGAHGSI VMTQTPKPLLVSAGDRVTTTCASQSVS
NDVANYQQKPGQSPKLLINPATNRYTGVPNRFTGSGYGTDFETISTVQA
EDLALYFCQDDYSSPWTFGGGTEKLEIK (SEQ ID NO:4)

FIG. 1B

A2 VH Murina

ATGGAATGCAGGATCTTTCTCTTCATCCTGTCAGGAAGTGCAGGTGTCCA
CTCCCAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTAGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGG
CTTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGATACACTTTCAGTCACTAT
GTTATAAGCTGGGTGAAGCAGAGAACTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGG
AGAGATTTATCCTGGAAGTAATAGTATTTATTACAAATGAGAAGTTCAAGG
GCAGGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAG
CTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGGGGTCTATTTCTGTGCAATGGG
GGGTAACTACGGCTTTGACTATTGGGGCCAAAGGCACCACTCTCACAGTCT
CCTCA (SEQ ID NO:5)

MEWRIFLFILSGTAGVHSQVQLQCSRPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDY
VISWVKQRTGQGLEWIGEIYPGSNSIYYNEKPKGRATLTADKSSSTAYMQ
LSSLTSEDSAVYFCAMGGNYGFDYWGQGTTLVSS (SEQ ID NO:6)

A2 VL Murina

ATGGATTTTCAGGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTAATCAGTGCCTCAGT
CATAATGTTCAGAGGACAAATTGTTCTCAGCCAGTCTCCAGCAATCATGT
CTGCATCTCTAGGGGAACGGGTACCTTGACCTGCACTGCCAGCTCAAGT
GTAAATTCCAATTACTTACACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCC
CAAACTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTC
GCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGC
ATGGAGGCTGAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAAGTATCATCGTTC
CCCGCTCACCTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA (SEQ ID NO:7)

MDPOVOIFSFLLISASVIMSRGQIVLTQSPAIMSASLGERTVLTCTASSS
VNSNYLHWYQKPGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSTSYSLTISS
MEAEADAATYYCHQYHRSPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:8)

FIG. 1C

A3 VH Murina

ATGCTGTTGGGGCTGAAGTGGGTTTTCTTTGTTGTTTTTTATCAAGGTGT
 GCATTGTGAGGTGCAGCTTGTGAGTCTGGTGGAGGATTGSGTGCAGCCTA
 AAGGCTCATTGAAACTCTCATGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCAATACC
 TACGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGTTTTGGAATGGGT
 TGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACATATTATGCCGATT
 CAGTGAAAGACAGGTTTACCCTCTCCAGAGATGATTACAAAGCATGCTC
 TATCTGCAAATGAACAACTTGAAACTGAAGACACAGCCATGTATT (G/A) CTG
 TGTGAGACASTGGGATTACGACGTCAGGGCTATGAACTACTGGGTCAGG
 GAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:9)

MLLGLKWVFFVVFYQGVHCEVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGPTFNT
YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSML
YLOMNNLKTEDTAMY (C/Y) CVRQWDYDVRAMNYWGQGSVTVSS (SEQ ID
 NO:10)

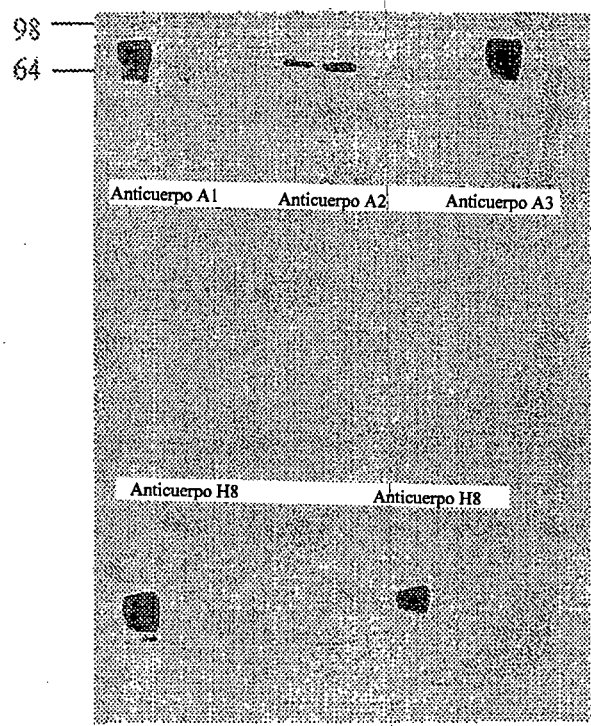
A3 VL Murina

ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGTATACATGTTGCTGTGGTTGTCTGG
 TGTTGAAGGAGACATTGTGATGACCCAGTCTCACATATTCACTGCCACAT
 CAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGAT
 ACTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAACTACT
 GATTIACTGGGCATCCACCCGGCTCACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAG
 GCAGTGGATCTGGGACGGATTTCACCTCTACCATTAGCAATGTGCAGTCT
 GAAGACTTGGCAGATTATTTCTGTGAGCAATATAGCAGCTATCCGTACAC
 GTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:11)

METHSQVFPVYMLLWLSGVEGDIVMTQSHIFMSTSVGDRVSITCRASQDVD
TAVAWYQOKFGQSPKLLIYWASTRLTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQS
EDLADYFCQOYSSYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:12)

234

FIG. 2



5/29

FIG. 3A

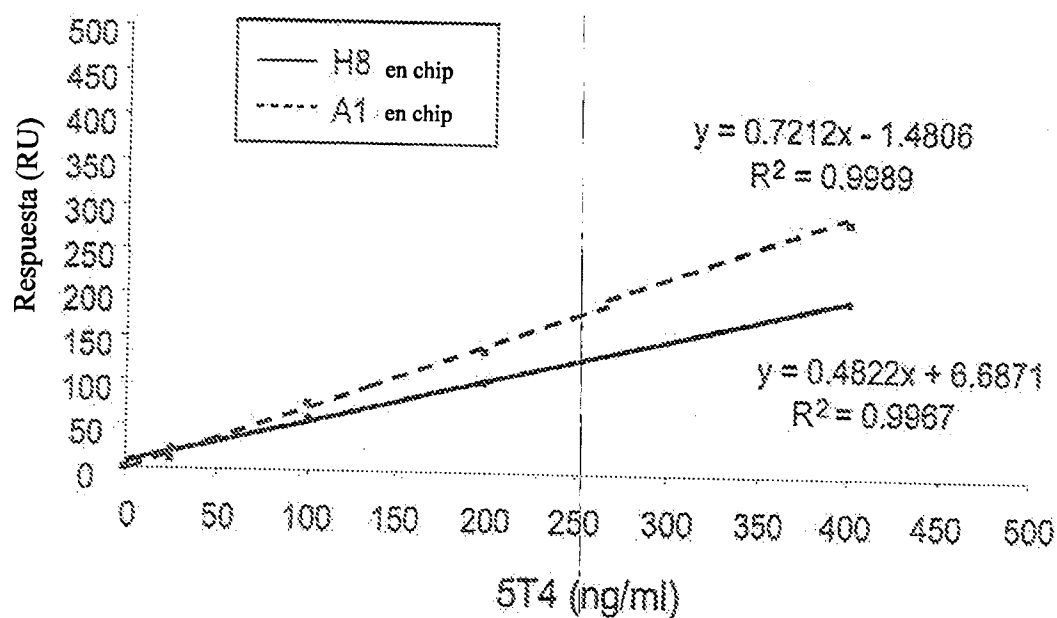
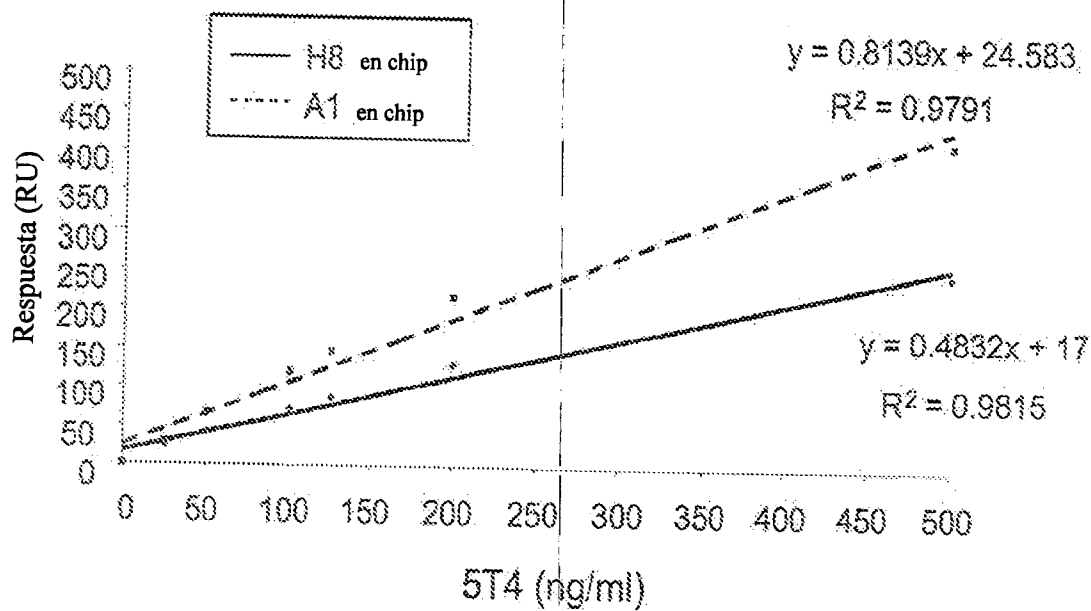


FIG. 3B



6/29

FIG. 4A

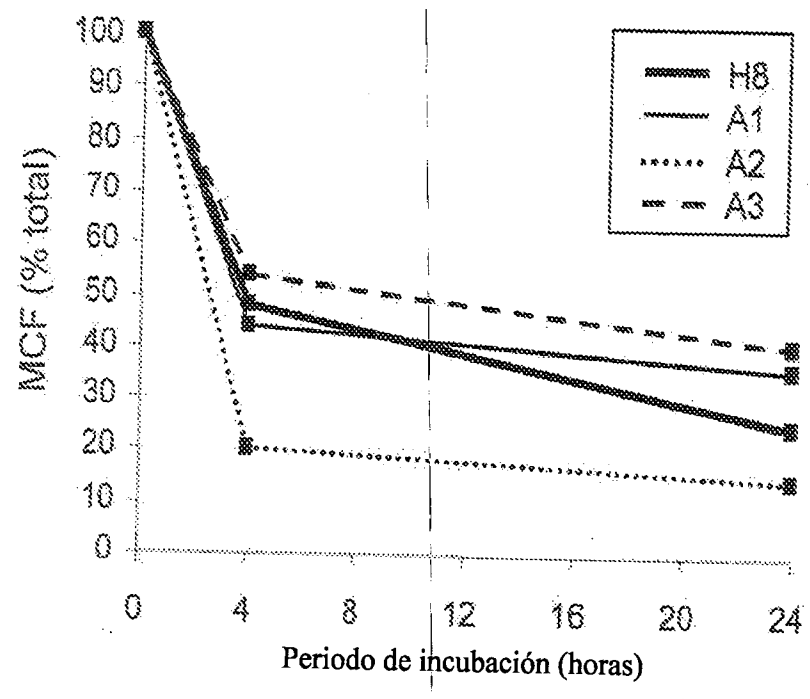
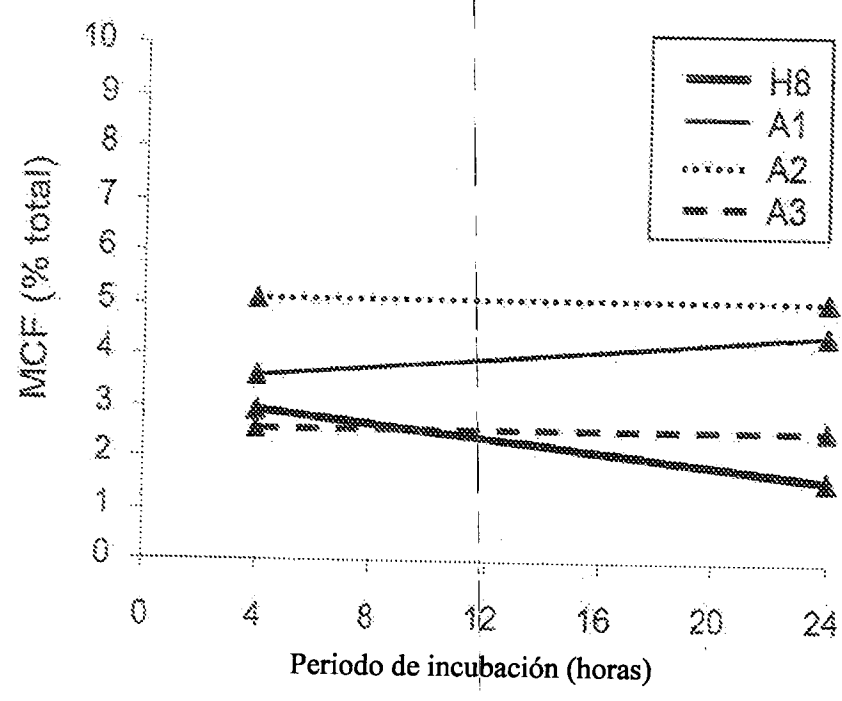


FIG. 4B



7/29

FIG. 4C

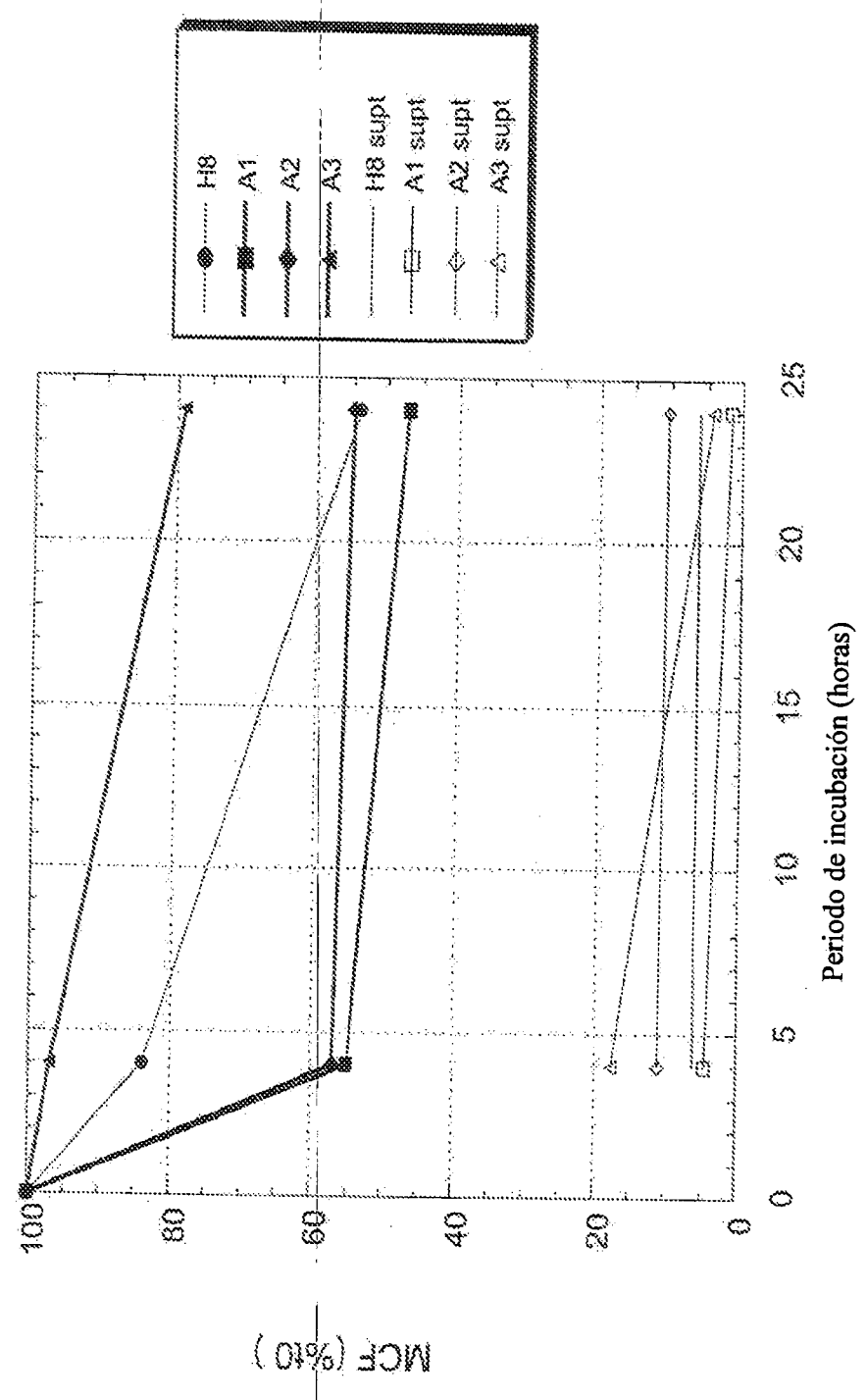
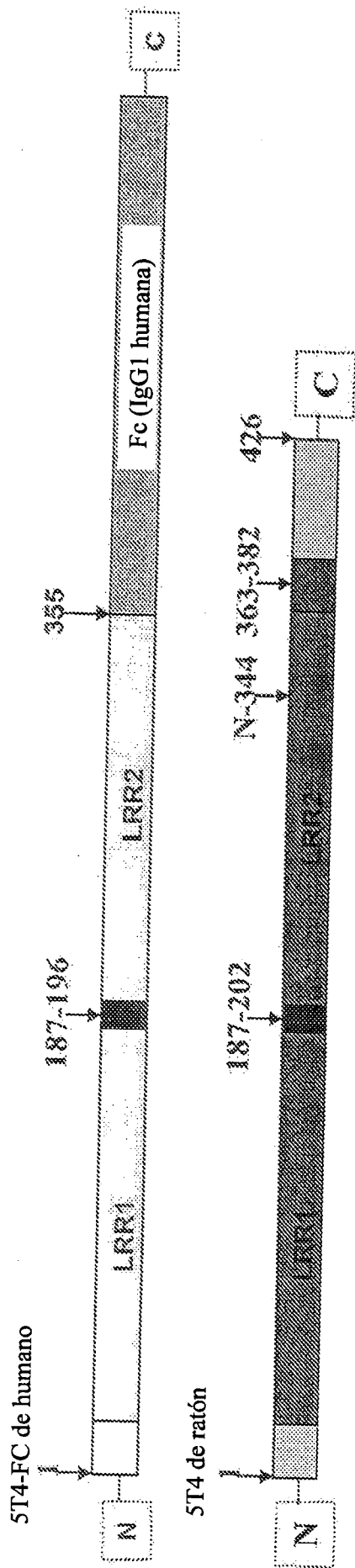


FIG. 5



1-172 humano/173-361 de ratón

humano

173

Ratón

361

IgG1 humana

1-172 de humano/173-258 de ratón/253-355 humano

humano

173

m258/h253

Ratón

humano

355

IgG1 humana

1-275 humano/282-361 de ratón +/- N-enlace de ratón en posición 344

humano

humano

361

IgG1 humana

1-82 humano/83-163 de ratón/164-355 humano

humano

m83

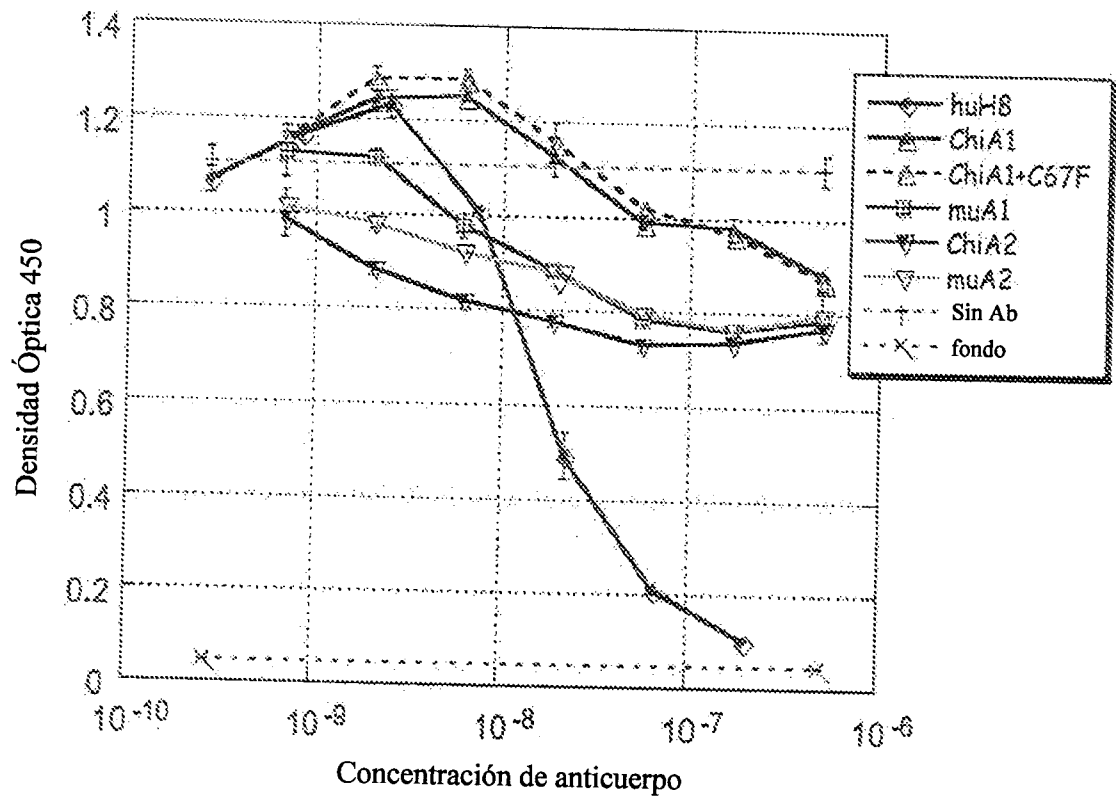
humano

355

IgG1 humana

9/29

FIG. 6A



244

10/29

FIG. 6B

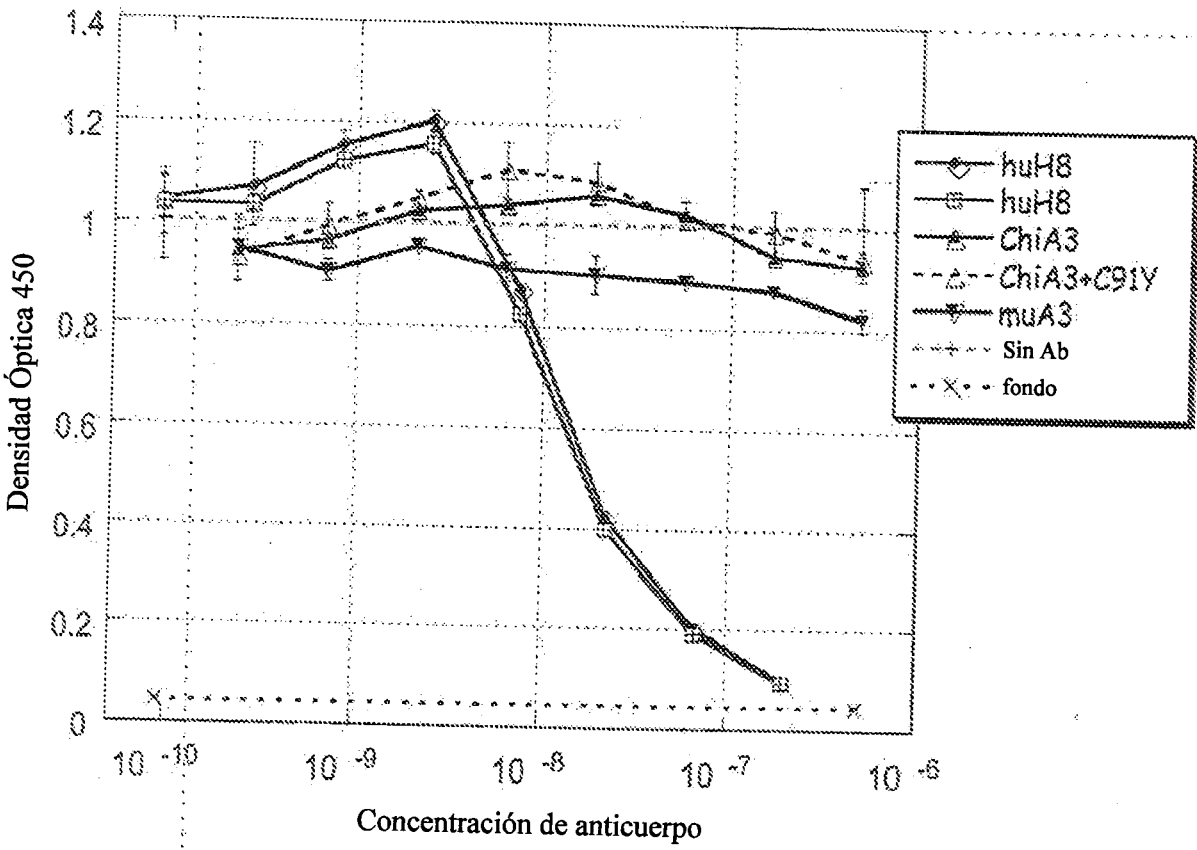


FIG. 7

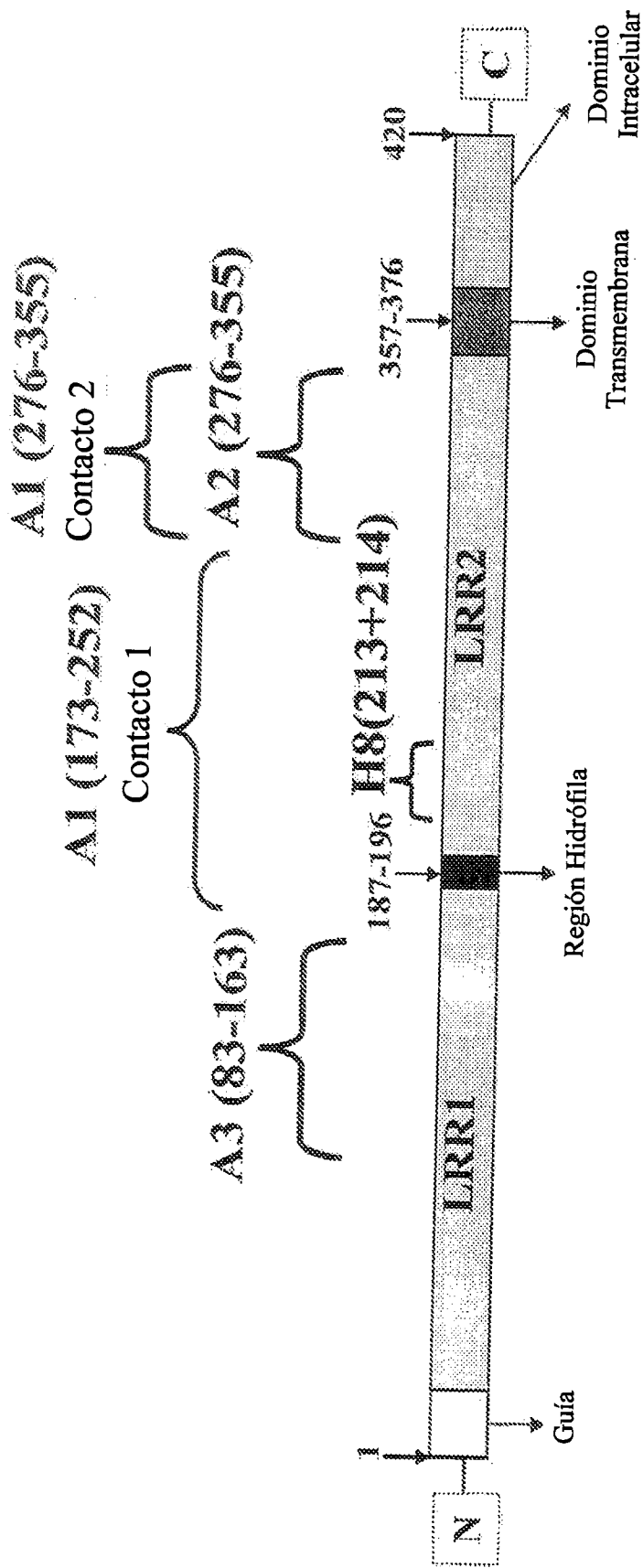
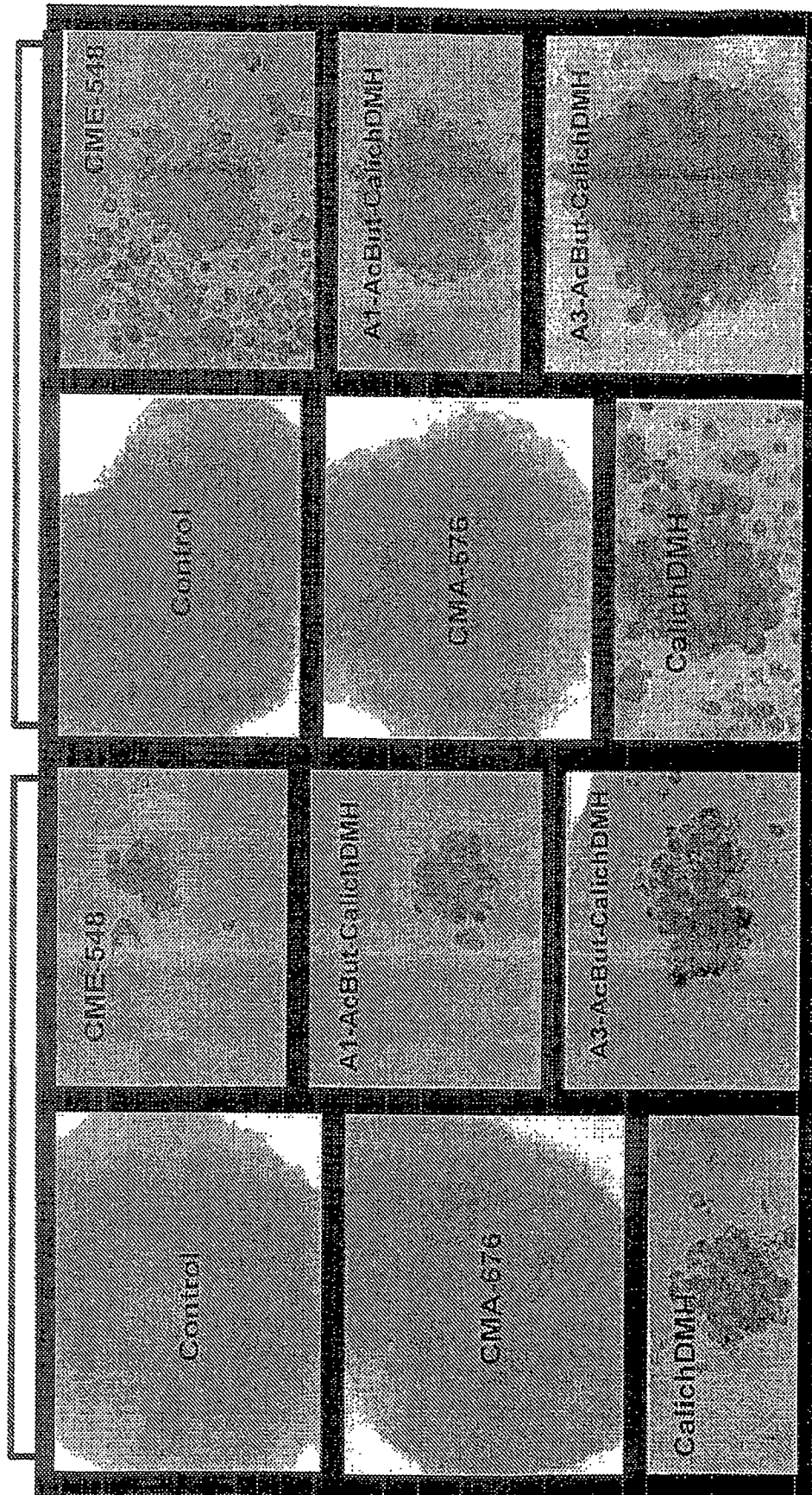


FIG. 8

MDAMB435/5T4

MDAMB435/neo



13/29

FIG. 9A

ADN de A1 VH Humanizada versión 1.0

CAGGTGCAGCTGGTGCATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG
GTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACCTTCACAACTTTGGAATGAACTGSGTGCGA
CAGGCCCTGGACAAGGGCTTAAGTGGATGGGATGGATAAACACCAACACTGGAGAG
CCAAGATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTC
AGCACTGCCATATCTGCAGATCTCCAGCCTGAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTAC
TGTGCCAGAGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCCTT
GTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:48)

Proteína de A1 VH Humanizada versión 1.0

QVQLVQSGSELEKPGASVKVSKASGYTFTNFGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTNTGE
PRYAEEFKGRFVPSLDTSVSTAYLQISSLKAE~~DTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQ~~GL
VTVSS (SEQ ID NO:49)

ADN de A1 VH Humanizada versión 1.1

CAGGTGCAGCTGGTGCATCTGGGTCTGAGTTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAG
GTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATATACCTTCACAACTTTGGAATGAACTGSGTGCGA
CAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAAGTGGATGGGATGGATAAACACCAACACTGGAGAG
CCAAGATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGTCTTCTCCTTGGACACCTCTGTC
AGCACTGCCATATCTGCAGATCTCCAGCCTGAAGGCTGAGGACACTGCCGTGTATTAC
TGTGCCAGAGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCCTT
GTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:50)

Proteína de A1 VH Humanizada versión 1.1

QVQLVQSGSELEKPGASVKVSKASGYTFTNFGMNWVRQAPGQGLEW~~MGWINTNTGE~~
PRYAEEFKGRFVPSLDTSVSTAYLQICSLKAE~~DTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQ~~GL
VTVSS (SEQ ID NO:51)

A1 VH Humanizada versión 1.2 (CDR injertada en la línea germinal DP-21, subgrupo VH7)

QVQLVQSGSELEKPGASVKVSKASGYTFTNFGMNWVRQAPGQGLEW~~MGWINTNTGE~~
PRYAEEFKGRFVPSLDTSVSTAYLQICSLKAE~~DTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQ~~GL
VTVSS (SEQ ID NO:52)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos se puede sustituir en estas posiciones designadas K46, C67, S82a y N82a.

14/29

FIG. 9B

ADN de A1 VH Humanizada versión 2.0

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATATACCTTCACAACTTTGGAATGAACTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCTGGATAAACACCAACACCGGTGAG
CCAAGATATGCTGAAGAGTTCAAGGGACGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAG
AACTCACTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCTGTGTATTAC
TGTGCCAGAGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTT
GTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:53)

Proteína de A1 VH Humanizada versión 2.0 (CDR injertada en la línea germinal DP-54, subgrupo VH3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFNFGMNWVRQAPGKGLEWVAVINTNTGE
PRYAEFFKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO:54)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos se puede sustituir en estas posiciones designadas K46, M48, G49, C67, L71, T73, T74, A75, S76 y A78.

ADN de A1 VH humanizada versión 2.1

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATATACCTTCACAACTTTGGAATGAACTGGGTCCGC
CAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCAACACCGGTGAG
CCAAGATATGCTGAAGAGTTCAAGGGAAGATTACCATCTCCCTGGACAACGCCAAG
TCCTCAGCCTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCTGTGTATTAC
TGTGCCAGAGACTGGGACGGTGCCTACTTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTT
GTCACAGTCTCCTCA (SEQ ID NO:55)

Proteína de A1 VH humanizada versión 2.1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFNFGMNWVRQAPGKGLKWMGWINTNTGE
PRYAEFFKGRFTISLDNAKSSAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWDGAYFFDYWGQGTL
VTVSS (SEQ ID NO:56)

15/29

FIG. 9C

ADN de A1 VL humanizada versión 1.0

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCC
ACCATCAACTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCTGACCGCTTCTCCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:57)

Proteína de A1 VL humanizada versión 1.0 (CDR injertada en la línea germinal DPK24, subgrupo VKIV)

DIVMTQSPFDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDAVWYQQKPGQPPLLIYFATNRYTG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQDYSSFWTFGQGTKVEIK (SEQ ID
NO:58)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos se puede sustituir en estas posiciones designadas S43, N49, N60, T63, Y67, F73, L85 y F87.

ADN de A1 VL humanizada versión 1.1

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGGGCC
ACCATCAACTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAGCAG
AAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCTGACCGCTTCTCCGGCAGCGGATACGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:59)

Proteína de A1 VL humanizada versión 1.1

DIVMTQSPFDSLAVSLGERATINCKASQSVSNDAVWYQQKPGQPPLLIYFATNRYTG
VPDRFSGSGYGTDFLTISSLQAEDVAVYYCQDYSSFWTFGQGTKVEIK (SEQ
ID NO:60)

ADN de A1 VL humanizada versión 2.0

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG
AAACCAGGCAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATTTTGGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGGCACTTACTACTGTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:61)

FIG. 9D

Proteína de A1 VL humanizada versión 2.0 (CDR injertada en la línea germinal DPK9, sub-grupo VKI)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNDAWYQOKPKAPKLLIYFATNRYTG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ
ID NO: 62)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos se puede sustituir en estas posiciones designadas V3, Q42, S43, N49, N60, Y67, F73, L85 y F87.

ADN de A1 VL humanizada versión 2.1

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGTCATCTGTCCGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG
AAACCAGGCCAAATCCCCTAAGCTCCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 63)

Proteína de A1 VL humanizada versión 2.1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNDAWYQOKPKSPKLLIYFATNRYTG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ
ID NO: 64)

ADN de A1 VL humanizada versión 2.2

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGTCATCTGTCCGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG
AAACCAGGCCAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCAATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO: 65)

Proteína de A1 VL humanizada versión 2.2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVSNDAWYQOKPKAPKLLIYFATNRYTG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ
ID NO: 66)

17/29

FIG. 9E

ADN de A1 VL humanizada versión 2.3

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG
AAACCAGGCCAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCAAACCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:67)

Proteína de A1 VL humanizada versión 2.3

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQSVSNDAWYQQKPKAPKLLIYFATNRYTG
VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGGGTKVEIK (SEQ
ID NO:68)

ADN de A1 VL humanizada versión 2.4

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG
AAACCAGGCCAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATACGGCACAGATTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:69)

Proteína de A1 VL humanizada versión 2.4

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQSVSNDAWYQQKPKAPKLLIYFATNRYTG
VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGGGTKVEIK (SEQ
ID NO:70)

ADN de A1 VL humanizada versión 2.5

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGAGACAGAGTC
ACCATCACTTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTATCAGCAG
AAACCAGGCCAAAGCCCCCTAAGCTCCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGA
GTCCCATCCCGCTTCAGCGGCAGCGGATCCGGCACAGATTTCACTTTACCATCAGC
AGCCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:71)

Proteína de A1 VL humanizada versión 2.5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICKASQSVSNDAWYQQKPKAPKLLIYFATNRYTG
VPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQDYSSPWTFGGGTKVEIK (SEQ
ID NO:72)

FIG. 9F

ADN de A1 VL humanizada versión 3.0

GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCCCTGTCTCCAGGCGAAAGAGCC
 ACCCTCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAGCAG
 AAACCTGGGCAGGCTCCAGGCTGCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGC
 ATCCCAGCCCGCTTCTCCGGCAGCGGCTCCGGCACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
 AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
 TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:73)

Proteína de A1 VL humanizada versión 3.0 (CDR injertada en la línea germinal DPK23, sub-grupo VKIII)

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASQSVSNDAVANYQOKPGQAPRLLIYFATNRYTG
 IPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQDYSSPWTFGGGTKVEIK (SEQ
 ID NO:74)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos se puede sustituir en estas posiciones designadas F10, S43, N49, V58, N60, Y67, F73, L85 y F87.

ADN de A1 VL humanizada versión 3.1

GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCCCTGTCTCCAGGCGAAAGAGCC
 ACCCTCTCCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTGGCTTGGTACCAGCAG
 AAACCTGGGCAGGCTCCAGGCTGCTGATCTATTTTGCAACCAATCGCTACACTGGC
 ATCCCAGCCCGCTTCTCCGGCAGCGGCTACGGCACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
 AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCC
 TGGACCTTCGGTCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAA (SEQ ID NO:75)

Proteína de A1 VL humanizada versión 3.1

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCKASQSVSNDAVANYQOKPGQAPRLLIYFATNRYTG
 IPARFSGSGYGTDFLTISSLQPEDFAVYYCQDYSSPWTFGGGTKVEIK (SEQ
 ID NO:76)

FIG. 9G

huA2 VH Versión 1.0 (CDR injertada en la línea germinal DP-75, subgrupo VH1)

QVQLVQSCAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYVISWVRQAPGQGLEWMGEIYPGSNS
IYYNEKFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARGGNYGFDYWGQGT
VSS (SEQ ID NO:77)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos se puede sustituir en estas posiciones designadas K38, R40, T41, I48, I69, T75, Q81, S82b, E85 y M94.

huA2 VH Versión 2.0 (CDR injertada en la línea germinal DP-54, subgrupo VH3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTDYVISWVRQAPGKGLEWVAETYPGENS
IYYNEKFKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGNYGFDYWGQGT
VSS (SEQ ID NO:78)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos se puede sustituir en estas posiciones designadas K38, R40, T41, I48, G49, A67, A71, K73, S74, S76, A78 y M94.

huA2 VH Versión 1.0 (CDR injertada en la línea germinal DPK20, subgrupo VHIII)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCTASSSVNSNYLHWYQQKPKGLAPRLLIYSTSNLAS
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCHQYHRSPLTFGGGTKVEIK (SEQ
ID NO:79)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos se puede sustituir en estas posiciones designadas S43, W47, A60, S70, S77, M78, y A80.

huA2 VH Versión 2.0 (CDR injertada en la línea germinal DPK9, subgrupo VKI)

DIQMTQSPFSSLSASVGRVPI TCTASSSVNSNYLHWYQQKPKAPKLLIYSTSNLAS
GVPSEFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCHQYHRSPLTFGGGTKVEIK (SEQ
ID NO:80)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos se puede sustituir en estas posiciones designadas V3, L4, S43, W47, S70, y M78.

254

20/29

FIG. 9H

huA3 VH Versión 1.0 (CDR injertada en la línea germinal DP-29, subgrupo VH3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIRSKSNN
YATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARQWDYDVRAMNYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 81)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos se puede sustituir en estas posiciones designadas A49, Q75, S76, M89, C91 y V93.

huA3 VH Versión 2.0 (CDR injertada en la línea germinal DP-54, subgrupo VH3)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNN
YATYYADSVKDRFTISRDNKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYCARQWDYDVRAMNYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 82)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos se puede sustituir en estas posiciones designadas D73, Q75, S76, M89, C91 y V93.

huA3 VL Versión 1.0 (CDR injertada en la línea germinal DPK24, subgrupo VHIV)

DIVMTQSPFDSLAVSLGERATINCKASQD VDTAVAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRLTG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYSSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ
 ID NO: 83)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos se puede sustituir en estas posiciones designadas S43, D85 y F87.

huA2 VL Versión 2.0 (CDR injertada en la línea germinal DPK9, subgrupo VHI)

DIVMTQSPFESLSASVGRVTITCKASQD VDTAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRLTG
VPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSYPYTFGQGTKLEIK (SEQ
 ID NO: 84)

Cualquiera de los siguientes aminoácidos se puede sustituir en estas posiciones designadas 3V, Q42, S43, D60, D85 y F87.

FIG. 10A

	FR1	CDR1	FR2	SEQ ID NO.
Consenso de VH1	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKASGYTFT		WVRQAPGQGLEWMG	25-27
Locus de VH1				
1-2 1-02	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKASGYTFT	G---YYMH	WVRQAPGQGLEWMG	14
1-3 1-03	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKASGYTFT	S--YAMH	WVRQAPGQGLEWMG	15
1-3 1-08	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKASGYTFT	S--YDIN	WVRQATGQGLEWMG	16
1-2 1-18	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKASGYTFT	S---YGIS	WVRQAPGQGLEWMG	17
1-U 1-24	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKASGYTFT	E---LSMH	WVRQAPGQGLEWMG	18
1-3 1-45	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKKASGYTFT	Y--RYLH	WVRQAPGQALEWMG	19
1-3 1-46	QVQLVQSGAEVKKPKGASVKVSKKASGYTFT	S--YYMH	WVRQAPGQGLEWMG	20
1-3 1-58	QVQLVQSGPEVKKPKGTSVKVSKKASGYTFT	S--SAVQ	WVRQARGQRLWIG	21
1-2 1-69	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKKASGGTFS	S--YALS	WVRQAPGQGLEWMG	22
1-2 1-e	QVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSKKASGGTFS	S--YALS	WVRQAPGQGLEWMG	23
1-2 1-f	EVQLVQSGAEVKKPKGATVKISKVSGYTFT	D--YYMH	WVQQAPGKGLEWMG	24

FIG. 10A (continuación)

CDR2 FR3 SEQ ID NO.

Consenso de VH1

Locus de VH1

1-3	1-02	WINE--NSGGTNYAOKFQG	RVTITRDTSTAYMELSLRSED [~] TAVYYCAR	25-27
1-3	1-03	WINA--GNGNTKYSQK [~] FQG	RVTMT [~] RDTSISTAYMELSLRSDDDTAVYYCAR	14
1-3	1-08	WMNP--NSGNTGYAOKFQG	RVTIT [~] PDTSASTAYMELSLRSED [~] TAVYYCAR	15
1-2	1-18	WISA--YNGNTNYAOKLQG	RVTMT [~] RNTSISTAYMELSLRSED [~] TAVYYCAR	16
1-0	1-24	GFDP--EDGETIYAOKFQG	RVTMT [~] TDTSSTAYMELSLRSDDDTAVYYCAR	17
1-3	1-45	WITP--ENGNTNYAOKFQD	RVTMT [~] EDTSTDTAYMELSLRSED [~] TAVYYCAT	18
1-3	1-46	LINE--SGGSTSYAOKFQG	RVTIT [~] DRMSSTAYMELSLRSED [~] TAVYYCAR	19
1-3	1-58	WIVV--GSGNTNYAOKFQE	RVTMT [~] RDTSSTAYMELSLRSED [~] TAVYYCAR	20
1-2	1-69	GIIP--IFGTANYAOKFQG	RVTIT [~] DRMSSTAYMELSLRSED [~] TAVYYCAA	21
1-2	1-e	GIIP--IFGTANYAOKFQG	RVTIT [~] AD [~] ESTSTAYMELSLRSED [~] TAVYYCAR	22
1-2	1-f	LVDP--EDGETIYAOKFQG	RVTIT [~] AD [~] KSTSTAYMELSLRSED [~] TAVYYCAR	23
			RVTIT [~] AD [~] TSTDTAYMELSLRSED [~] TAVYYCAT	24

FIG. 10B

Secuencias de aminoácidos de genes de línea germinal humana de subgrupo VH7
DP-21 (VH 7) GenBank Acceso No. CAA43346 (SEQ ID NO:88)

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMNWVRQAPGGGLEWMG
WIN
TNTGNFTYAQGFTGRFVPSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDSTRGYSY
DFWSGYFYYYMDVWGKGTTTVTVSS

Secuencias de aminoácidos de genes de línea germinal humana de subgrupo VH3
DP-54 (VH 3-07) GenBank Acceso No. AB019440 (SEQ ID NO:89)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMSWVRQAPGKGLEWVANI
KQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

DP-47 (VH3-23) GenBank . Acceso No. AB019439 (SEQ ID NO:90)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIS
GSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK

DP-49 (VH 3-30) GenBank . Acceso No. AB019439 (SEQ ID NO:91)

QVQLVESGGGVVQPGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
SYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

DP-53 (VH3-74) GenBank . Acceso No. AB019437 (SEQ ID NO:92)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMHWVRQAPGKGLVWVSRI
NSDGSSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

DP-48 (VH3-13) GenBank Acceso No. AB019440 (SEQ ID NO:93)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQATGKGLEWVSAI
GTAGDTYYPGSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAGDTAVYYCAR

FIG. 11

SEQ ID NO.		CDR1									
29	L16...lineagerminal	...	EIVMTQS	PATLSVSPGE	RATLSQ	CRASQ	SVSS	NLA	WY	Q	QKPGQAPRL
30	L2...lineagerminal	...	EIVMTQS	PATLSVSPGE	RATLSQ	CRASQ	SVSS	NLA	WY	Q	QKPGQAPRL
31	A27_lineagerminal_VL	...	EIVLTQS	PATLSLSPGE	RATLSQ	CRASQ	SVSS	YL	WY	Q	QKPGQAPRL
32	L6_lineagerminal_VL	...	EIVLTQS	PATLSLSPGE	RATLSQ	CRASQ	SVSS	YL	WY	Q	QKPGQAPRL
33	L10_lineagerminal_VL	...	EIVMTQS	PATLSLSPGE	RATLSQ	CRASQ	SVSS	YL	WY	Q	QKPGQAPRL
34	L25_lineagerminal_VL	...	EIVMTQS	PATLSLSPGE	RATLSQ	CRASQ	SVSS	YL	WY	Q	QKPGQAPRL
		CDR2									
29	L16...lineagerminal	L	I	Y	G	A	S	T	R	A	T
30	L2...lineagerminal	L	I	Y	G	A	S	T	R	A	T
31	A27_lineagerminal_VL	L	I	Y	G	A	S	S	R	A	T
32	L6_lineagerminal_VL	L	I	Y	D	A	S	N	R	A	T
33	L10_lineagerminal_VL	L	I	Y	G	A	S	T	R	A	T
34	L25_lineagerminal_VL	L	I	Y	G	A	S	T	R	A	T
		CDR3									
29	L16...lineagerminal	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G
30	L2...lineagerminal	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G
31	A27_lineagerminal_VL	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G
32	L6_lineagerminal_VL	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G
33	L10_lineagerminal_VL	S	I	P	A	R	F	S	G	S	G
34	L25_lineagerminal_VL	G	I	P	A	R	F	S	G	S	G

FIG. 12

SEQ ID NO.		FR1	CDR1	FR2
35	012	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQSISS----	WYQQKPGKAPKLLIY
36	02	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQSISS----	WYQQKPGKAPKLLIY
37	018	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	QASQDISSN-----	WYQQKPGKAPKLLIY
38	08	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	QASQDISSN-----	WYQQKPGKAPKLLIY
39	A20	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQGISN-----	WYQQKPGKAPKLLIY
40	L1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQGISN-----	WYQQKPGKAPKLLIY
41	L15	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQGISN-----	WYQQKPGKAPKLLIY
42	L8	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQGISN-----	WYQQKPGKAPKLLIY
43	L12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQGISN-----	WYQQKPGKAPKLLIY
44	L11	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	RASQSISS-----	WYQQKPGKAPKLLIY

FIG. 12 (continuación)

SEQ ID NO.

35	012	AASSLQS	GVPSRFSGSGTDFLTITSSSQPEDFATYYC	CDR3	QQSYSTP
36	02	AASSLQS	GVPSRFSGSGTDFLTITSSSQPEDFATYYC		QQSYSTP
37	018	DASNLET	GVPSRFSGSGTDFLTITSSSQPEDFATYYC		QQYDNLP
38	08	DASNLET	GVPSRFSGSGTDFLTITSSSQPEDFATYYC		QQYDNLP
39	A20	AASTLQS	GVPSRFSGSGTDFLTITSSSQPEDFATYYC		QKYNAP
40	L11	AASSLQS	GVPSRFSGSGTDFLTITSSSQPEDFATYYC		QQYNSYP
41	L15	AASSLQS	GVPSRFSGSGTDFLTITSSSQPEDFATYYC		QQYNSYP
42	L8	AASTLQS	GVPSRFSGSGTDFLTITSSSQPEDFATYYC		QQYNSYP
43	L12	DASSLES	GVPSRFSGSGTDFLTITSSSQPEDFATYYC		QQYNSYS
44	L11	DASSLES	GVPSRFSGSGTDFLTITSSSQPEDFATYYC		QQYNSYS

FIG. 13

Secuencias de aminoácidos de genes de línea germinal humana del subgrupo Vk I
DPK9 (O12, Vk I) GenBank Acceso No. X59315 (SEQ ID NO:94)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

O2 (O2, Vk I) GenBank Acceso No. X59312 (SEQ ID NO:95)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP

DPK 1 (Vk I, I18) GenBank Acceso No. M64856 (SEQ ID NO:96)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASN
LETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDFATYYCQQYDNL

DPK 7 (Vk I, L15) GenBank Acceso No. K01323 (SEQ ID NO:97)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASS
LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYP

Secuencias de aminoácidos de genes de línea germinal humana del subgrupo Vk IV

DPK24 (B3, VkiV) GenBank Acceso No. Z00023 (SEQ ID NO:98)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKL
LIYWASTRESGVPRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDEVAVYYCQQYYSTP

Secuencias de aminoácidos de genes de línea germinal humana del subgrupo Vk III

DPK 23 (Vk-III, L25) GenBank Acceso No. X72820 (SEQ ID NO:99)

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLSWYQQKPGQAPRLLIYGAST
RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQDYNLP

FIG. 14

IgG4 humana_mutada (mutación de articulación S241P)= (SEQ ID NO:45)
 ASTKGPSVFPLAFCRSTSESTAALGCLVKDYFPEFVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEF
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQV
 YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF
 LYERLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

IgG1 humana (SEQ ID NO:46)
 ASTKGPSVFPLAFCRSTSESTAALGCLVKDYFPEFVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEF
 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Kappa humana SEQ IS NO:47)
 TVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKIDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

29/29

FIG. 15

5T4 de mono tití de cola negra

MPGGCSRGPAAAGNGRLRLARLALVLLGWVSSSSFTSSASSSSSSAPFLASAVSAQPL
LPGQCPALCECSEAARTVKVNRNLTEVPTDLPPYVRNLFLTGNQLAVLPAGAFARV
PPLAELAAALNLSSRLLEDVQAGAFEHLPSLRQLDLSHNPLAVLSPFAFSGSNASVSA
PSPLVELILNHIVPPEDERNNRSFEGMVVAALRAGGALHGLHRLELASNHFLYLPRD
VLAQLPSLRHLDLNNSLVSLTYVSFRNLTHLESLEHLEDNALKVLHNGTLAELOGLP
HVRVFLDNNPWVCDCHMADMVAWLKETEVVQGYQLTCAFPEKMRNRVLELNSADL
DCDPILPPSLQTSYVFLGIVLALIG (SEQ ID NO:85)

5T4 de mono cynomologus

MPGGCSRGPAAAGDGRRLRLARLALVLLGWVSSSSFTSSASSFSSSAPFLASAASAQPP
LPDQCPALCECSEAARTVKVNRNLTEVPTDLPLYVRNLFLTGNQLAVLPAGAFARR
PPLAELAAALNLSSRLDEVRAQAFEHLPSLRQLDLSHNPLAVLSPFAFSGSNASISA
PSPLVELILNHIVPPDDKRONRSFEGMVAAALVAGRALQGLHLELASNHFLYLPRD
VLAQLPSLRHLDLNNLSLVSLTYVSFRNLTHLESLEHLEDNALKVLHNGTLAELOGLP
HVEVFLDNNPWVCDCHMADMVTWLKQTEVVQGDRLTCAFPEKMRNRVLELNSADL
DCDPILPPSLQTSYVFLGIVLALIGAFLLVLYLNREGIKKWMHNIRDACRDHMEGY
HYRYEINADPRLTNLSSNSDV (SEQ ID NO:86)

<110> WYETH
Boghaert, Erwin
Damle, Nitin
Hamann, Philip
Khandke, Kiran
Kunz, Arthur
Marquette, Kimberly
Tchistiakova, Lioudmila
Gill, Davinder
Sreekumar, Kodangattil

<120> ANTI-5T4 ANTIBODIES AND USES THEREOF

<130> 040000-0359813

<140>
<141>

<150> 60/891,248
<151> 2007-02-23

<150> 60/781,346
<151> 2006-03-10

<160> 99

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 414
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(57)
<223> leader sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(414)
<223> heavy chain variable region

<220>
<221> misc_difference
<222> (260)..(260)
<223> n is g or t

<400> 1
atggattggc tgtggaactt gctattcctg atggcagctg cccaaagtat ccaagcacag 60
atccagttgg tgcagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120
tgcaaggctt ctggatatac cttcaciaaac tttggaatga actgggtgaa gcagggtcca 180

```

ggagaggggtt taaagtggat gggctggata aacaccaaca ctggagagcc aagatatgct      240
gaagagttca agggacggtt tgccttttct ttggaaacca ctgccagcac tgcctatttg      300
cagatcaaca acctcaaaaa tgaggacacg gctacatatt tctgtgcaag agactgggac      360
ggtgcctact tctttgacta ctgggggcaa ggcaccactc tcacagtctc ctca          414

```

```

<210> 2
<211> 138
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(19)
<223> leader sequence

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(138)
<223> heavy chain variable region

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(54)
<223> CDR1

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (69)..(85)
<223> CDR2

```

```

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (87)..(87)
<223> Xaa is cystein (C) or phenylalanine (F); this is position 67 with
      numbering according to Kabat

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (118)..(127)
<223> CDR3

```

```

<400> 2

```

```

Met Asp Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1           5           10          15

```

```

Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
      20           25           30

```

```

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
      35           40           45

```

Thr Asn Phe Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Gly Pro Gly Glu Gly Leu
50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Arg Tyr Ala
65 70 75 80

Glu Glu Phe Lys Gly Arg Xaa Ala Phe Ser Leu Glu Thr Thr Ala Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Trp Asp Gly Ala Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 3
<211> 381
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(60)
<223> leader sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(381)
<223> light chain variable region

<400> 3
atgaagtcac agaccaggt cttcgtatct ctactgctct gtgtgtcttg tgctcatggg 60
agtattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttggtt cagcaggaga cagggtgacc 120
ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca acagaagcca 180
gggcagtctc ctaaactgtt gataaacttt gcaaccaatc gctacactgg agtccctaata 240
cgcttcactg gcagtggata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggct 300
gaagacctgg cactttatct ctgtcagcag gattatagct ctccgtggac gttcgggtgga 360
ggcaccaagc tggaaatcaa a 381

<210> 4
<211> 127

267

<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(20)
<223> leader sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(127)
<223> light chain variable region

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (44)..(54)
<223> CDR1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (70)..(76)
<223> CDR2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (109)..(117)
<223> CDR3

<400> 4

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 Lys 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

Lys Leu Leu Ile Asn Phe Ala Thr Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asn
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
85 90 95

Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr
100 105 110

Ser Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 5
<211> 405
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(54)
<223> leader sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)..(405)
<223> heavy chain variable region

<400> 5
atggaatgga ggatctttct cttcatcctg tcaggaactg caggtgtcca ctcccaggtt 60
cagctgcagc agtctagacc tgagctggtg aagcctgggg cttcagtga gatgtcctgc 120
aaggcttctg gatacacttt cactgactat gttataagct gggatgaagca gagaactgga 180
cagggccttg agtggattgg agagatttat cctggaagta atagtattta ttacaatgag 240
aagttcaagg gcagggccac actgactgca gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag 300
ctcagcagcc tgacatctga ggactctgcg gtctatttct gtgcaatggg gggtaactac 360
ggctttgact attggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 405

<210> 6
<211> 135
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(18)
<223> leader sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(135)
<223> heavy chain variable region

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (44)..(53)
<223> CDR1

<220>
<221> MISC_FEATURE

<222> (68)..(84)
<223> CDR2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (117)..(124)
<223> CDR3
<400> 6

Met Glu Trp Arg Ile Phe Leu Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly Val
1 5 10 15

His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Arg Pro Glu Leu Val Lys Pro
20 25 30

Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
35 40 45

Asp Tyr Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Asn Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu
65 70 75 80

Lys Phe Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr
85 90 95

Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
100 105 110

Phe Cys Ala Met Gly Gly Asn Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 7
<211> 390
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(66)
<223> leader sequence

<220>
<221> misc_feature

<222> (67)..(390)
<223> light chain variable region

<400> 7
atggattttc aggtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc 60
agaggacaaa ttgtttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctct aggggaacgg 120
gtcaccttga cctgcactgc cagctcaagt gtaaattcca attacttaca ctggtaccag 180
cagaagccag gatcctcccc caaactctgg atttatagca catccaacct ggcttctgga 240
gtcccagctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcagc 300
atggaggctg aagatgctgc cacttattac tgccaccagt atcatcgttc cccgctcacg 360
ttcgggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa 390

<210> 8
<211> 130
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(22)
<223> leader sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(130)
<223> light chain variable region

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (46)..(56)
<223> CDR1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (73)..(79)
<223> CDR2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (112)..(120)
<223> CDR3

<400> 8

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

271

Met Ser Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Asn Ser Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
50 55 60

Ser Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His
100 105 110

Gln Tyr His Arg Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Leu Lys
130

<210> 9
<211> 423
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(57)
<223> leader sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(423)
<223> heavy chain variable region

<220>
<221> misc_difference
<222> (347)..(347)
<223> n is g or a

<400> 9
atgctgttgg ggctgaagtg ggttttcttt gttgtttttt atcaaggtgt gcattgtgag 60
gtgcagcttg ttgagtctgg tggaggattg gtgcagccta aagggtcatt gaaactctca 120
tgtgcagcct ctggattcac cttcaatacc tacgccatga actgggtccg ccaggctcca 180
ggaaaggggt tggaatgggt tgctcgcata agaagtaaaa gtaataatta tgcaacatat 240

272

tatgccgatt cagtgaaga caggttcacc atctccagag atgattcaca aagcatgctc 300
tatctgcaaa tgaacaactt gaaaactgaa gacacagcca tgtattnctg tgtgagacag 360
tgggattacg acgtcagggc tatgaactac tgggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 420
tca 423

<210> 10
<211> 141
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(19)
<223> leader sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(141)
<223> heavy chain variable region

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (45)..(54)
<223> CDR1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (69)..(87)
<223> CDR2

<220>
<221> MUTAGEN
<222> (116)..(116)
<223> Xaa is cysteine (C) or tyrosine (Y); this is position 91 with
numbering according to Kabat

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (120)..(130)
<223> CDR3

<400> 10

Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Val Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly
1 5 10 15

Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

273

Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95

Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Met Tyr Xaa Cys Val Arg Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met
115 120 125

Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 11
<211> 381
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(60)
<223> leader sequence

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)..(381)
<223> light chain variable region

<400> 11
atggagacac attctcaggt ctttgatatac atgttgctgt ggttgctctgg tgttgaagga 60
gacattgtga tgaccagtc tcacatattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120
atcacctgca aggcagtc g gatgtggat actgctgtag cctggatatca acagaaacca 180
gggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggctcactgg agtccctgat 240
cgcttcacag gcagtggatc tgggacggat ttcactctca ccattagcaa tgtgcagtct 300
gaagacttgg cagattatatt ctgtcagcaa tatagcagct atccgtacac gttcggaggg 360
gggaccaagc tggaataaaa a 381

<210> 12
<211> 127

234

<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(20)
<223> leader sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (21)..(127)
<223> light chain variable region

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (44)..(54)
<223> CDR1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (70)..(76)
<223> CDR2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (109)..(117)
<223> CDR3

<400> 12

Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Ile Phe Met Ser
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Val Asp Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Leu Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser
100 105 110

275

Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 13
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

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> 14
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

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> 15
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

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> 16
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

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> 17
- <211> 98
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<400> 17

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

228

Ala Arg

<210> 18
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<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 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> 19
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

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> 20
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

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

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> 21
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

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> 22
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

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> 23
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

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> 24
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

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> 25
<211> 30
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> consensus sequence of human VH1 heavy chain variable region
framework 1

<400> 25

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> 26
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> consensus sequence of human VH1 heavy chain variable region
framework 2

<400> 26

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
1 5 10

<210> 27
<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> consensus sequence of human VH1 heavy chain variable region
framework 3

<400> 27

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> 28

<211> 101

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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> 29

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

284

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> 30
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

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> 31
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

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

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

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

<210> 32
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

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

266

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

<210> 33
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

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

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> 34
<211> 96
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

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> 35
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

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> 36
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

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> 37
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

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> 38
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

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> 39
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

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> 40
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

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> 41
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

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> 42
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

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> 43
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 43

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> 44
<211> 95

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

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> 45
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

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
 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> 46
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

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 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

295

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> 47
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

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 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> 48
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 48
caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaagggt 60
tcctgcaagg cttctggata taccttcaca aactttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttaagtg gatgggatgg ataaacacca aactggaga gccaagatat 180
gctgaagagt tcaagggacg gtttgtcttc tccttgga cctctgtcag cactgcctat 240
ctgcagatct ccagcctgaa ggctgaggac actgccgtgt attactgtgc cagagactgg 300
gacgggtgcct acttctttga ctactggggc caaggcaccc ttgtcacagt ctctca 357

<210> 49
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(35)
<223> CDR1

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(66)
<223> CDR2

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(108)
<223> CDR3

<400> 49

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 50
caggtgcagc tgggtgcaatc tgggtctgag ttgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60
tcctgcaagg cttctggata taccttcaca aactttggaa tgaactgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg ataaacacca aactggaga gccaagatat 180
gctgaagagt tcaagggacg gtttgtcttc tccttgga cctctgtcag cactgcctat 240
ctgcagatct ccagcctgaa ggctgaggac actgccgtgt attactgtgc cagagactgg 300

gacgggtgcct acttctttga ctactggggc caaggcacc ttgtcacagt ctcctca 357

<210> 51
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> derived from human and mouse sequences
 <400> 51

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 52
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> derived from human and mouse sequences
 <400> 52

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 53
<211> 357
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 53
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggata taccttcaca aactttggaa tgaactgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg ggctggagtg ggtggcctgg ataaacacca acaccgtga gccaagatat 180
gctgaagagt tcaagggacg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac accgctgtgt attactgtgc cagagactgg 300
gacgggtgcct acttctttga ctactggggc caaggcaccc ttgtcacagt ctctca 357

<210> 54
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 54

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe
20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 55

<211> 357

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> derived from human and mouse sequences

<400> 55

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggata taccttcaca aactttggaa tgaactgggt ccgccaggct 120

ccaggggaagg ggctgaagtg gatgggctgg ataaacacca acaccggtga gccaagatat 180

gctgaagagt tcaagggacg attcaccatc tccttgaca acgccaagtc ctcagcctat 240

ctgcaaata acagcctgag agccgaggac accgctgtgt attactgtgc cagagactgg 300

gacggtgcct acttctttga ctactggggc caaggcaccc ttgtcacagt ctctca 357

<210> 56
<211> 119
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 56

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe
20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 57
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 57

gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60

atcaactgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtacca gcagaaacca 120

ggacagcctc ctaagctgct catttacttt gcaaccaatc gctacactgg agtccctgac 180

```
cgcttctccg gcagcggatc cggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaggct 240
gaagatgtgg cagtttatta ctgtcagcag gattatagct ctccctggac cttcggtcag 300
ggcaccaagg tggaaatcaa a 321
```

```
<210> 58
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 58
```

```
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 Phe Ala Thr Asn Arg Tyr Thr 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 Ser Ser Pro Trp
          85          90          95

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

```
<210> 59
<211> 321
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 59
```

```
Gly Ala Cys Ala Thr Cys Gly Thr Gly Ala Thr Gly Ala Cys Cys Cys
1          5          10          15
```

Ala Gly Thr Cys Thr Cys Cys Ala Gly Ala Cys Thr Cys Cys Cys Thr
20 25 30

Gly Gly Cys Thr Gly Thr Gly Thr Cys Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys
35 40 45

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Cys Cys Ala Cys Cys Ala Thr Cys Ala
50 55 60

Ala Cys Thr Gly Cys Ala Ala Gly Gly Cys Cys Ala Gly Thr Cys Ala
65 70 75 80

Gly Ala Gly Thr Gly Thr Gly Ala Gly Thr Ala Ala Thr Gly Ala Thr
85 90 95

Gly Thr Gly Gly Cys Thr Thr Gly Gly Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys
100 105 110

Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala Gly Cys Cys
115 120 125

Thr Cys Cys Thr Ala Ala Gly Cys Thr Gly Cys Thr Cys Ala Thr Thr
130 135 140

Thr Ala Cys Thr Thr Thr Gly Cys Ala Ala Cys Cys Ala Ala Thr Cys
145 150 155 160

Gly Cys Thr Ala Cys Ala Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Cys Cys Cys
165 170 175

Thr Gly Ala Cys Cys Gly Cys Thr Thr Cys Thr Cys Cys Gly Gly Cys
180 185 190

Ala Gly Cys Gly Gly Ala Thr Ala Cys Gly Gly Cys Ala Cys Ala Gly
195 200 205

Ala Thr Thr Thr Cys Ala Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys Cys Ala Thr
210 215 220

Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Cys Thr Gly Cys Ala Gly Gly Cys Thr
225 230 235 240

Gly Ala Ala Gly Ala Thr Gly Thr Gly Gly Cys Ala Gly Thr Thr Thr
245 250 255

Ala Thr Thr Ala Cys Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Ala
260 265 270

Thr Thr Ala Thr Ala Gly Cys Thr Cys Thr Cys Cys Cys Thr Gly Gly
275 280 285

Ala Cys Cys Thr Thr Cys Gly Gly Thr Cys Ala Gly Gly Gly Cys Ala
290 295 300

Cys Cys Ala Ala Gly Gly Thr Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala
305 310 315 320

Ala

<210> 60
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 60

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

Ser Gly Tyr 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 Ser Ser Pro Trp
85 90 95

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

<210> 61
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> derived from human and mouse sequences

<400> 61
 gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtatca gcagaaacca 120
 ggcaaagccc ctaagctcct gatctatctt gcaaccaatc gctacactgg agtcccatcc 180
 cgcttcagcg gcagcggatc cggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcagcag gattatagct ctccctggac cttcggtcag 300
 ggcaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 62
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> derived from human and mouse sequences

<400> 62

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Phe Ala Thr Asn Arg Tyr Thr 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 Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95

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

<210> 63
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 63
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtatca gcagaaacca 120
ggcaaattccc ctaagctcct gatctatttt gcaaccaatc gctacactgg agtcccatcc 180
cgcttcagcg gcagcggatc cggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag gattatagct ctccctggac cttcggtcag 300
ggcaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 64
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 64

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

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

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

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

307

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 Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95

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

<210> 65
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 65
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtatca gcagaaacca 120
ggcaaagccc ctaagctcct gatcaatttt gcaaccaatc gctacactgg agtcccatcc 180
cgcttcagcg gcagcggatc cggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag gattatagct ctcctggac cttcggtcag 300
ggcaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 66
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 66

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

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

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

Asn Phe Ala Thr Asn Arg Tyr Thr 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 Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95

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

<210> 67
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 67
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtatca gcagaaacca 120
ggcaaagccc ctaagctcct gatctatddd gcaaccaatc gctacactgg agtcccaaac 180
cgcttcagcg gcagcggatc cggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct 240
gaagatdddg caacttacta ctgtcagcag gattatagct ctcctggac cttcggtcag 300
ggcaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 68
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 68

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

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

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

Tyr Phe Ala Thr Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asn 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 Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95

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

<210> 69
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 69
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtc gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtatca gcagaaacca 120
ggcaaagccc ctaagctcct gatctatctt gcaaccaatc gctacactgg agtcccatcc 180
cgcttcagcg gcagcggata cggcacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag gattatagct ctccctggac cttcggtcag 300
ggcaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 70
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 70

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

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

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

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

Ser Gly Tyr 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 Asp Tyr Ser Ser Pro Trp
85 90 95

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

<210> 71
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 71
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cagagtcacc 60
atcacttgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtatca gcagaaacca 120
ggcaaagccc ctaagctcct gatctatctt gcaaccaatc gctacactgg agtcccatcc 180
cgcttcagcg gcagcggatc cggcacagat ttcactttca ccatcagcag cctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcagcag gattatagct ctccctggac cttcggtcag 300
ggcaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 72
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<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 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 73
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 73
gaaattgtga tgacacagtc tccagccacc ctgtccctgt ctccaggcga aagagccacc 60
ctctcctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtacca gcagaaacct 120
gggcaggctc ccaggctgct gatctatattt gcaaccaatc gctacactgg catcccagcc 180
cgcttctccg gcagcggctc cggcacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag gattatagct ctccctggac cttcggtcag 300
ggcaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 74
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 74

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 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

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

Tyr Phe Ala Thr Asn Arg Tyr 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 Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 75

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> derived from human and mouse sequences

<400> 75

gaaattgtga tgacacagtc tccagccacc ctgtccctgt ctccaggcga aagagccacc 60

ctctcctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtgg cttggtacca gcagaaacct 120

gggcaggctc ccaggctgct gatctatattt gcaaccaatc gctacactgg catcccagcc 180

cgcttctccg gcagcggcta cggcacagac ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag gattatagct ctccctggac cttcggtcag 300

ggcaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 76

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> derived from human and mouse sequences

<400> 76

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 Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 77

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> derived from human and mouse sequences

<400> 77

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 Asp Tyr
20 25 30

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

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

Lys 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 Gly Gly Asn Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 78

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> derived from human and mouse sequences

<400> 78

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 79
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 79

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 Thr Ala Ser Ser Ser Val Asn Ser Asn
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Leu Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser 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 His Gln Tyr His Arg Ser Pro
85 90 95

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

<210> 80
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 80

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 Thr Ala Ser Ser Ser Val Asn Ser Asn
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser 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 Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr His Arg Ser Pro
85 90 95

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

<210> 81
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 81

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Tyr Cys Ala Arg Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met Asn Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 82
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 82

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Gln Trp Asp Tyr Asp Val Arg Ala Met Asn Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 83
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 83

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 Asp Val Asp Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Leu Thr 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 Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 84
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> derived from human and mouse sequences

<400> 84

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Leu Thr 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 Ser Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 85
<211> 367
<212> PRT
<213> marmosets

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(29)
<223> leader sequence

<220>
<221> mat_peptide
<222> (30)..(367)
<223> mature peptide - partial sequence

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (30)..(356)
<223> ectodomain

<400> 85

Met Pro Gly Gly Cys Ser Arg Gly Pro Ala Ala Gly Asn Gly Arg Leu
-25 -20 -15

Arg Leu Ala Arg Leu Ala Leu Val Leu Leu Gly Trp Val Ser Ser Ser
-10 -5 -1 1

Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Pro Phe Leu
5 10 15

Ala Ser Ala Val Ser Ala Gln Pro Leu Leu Pro Gly Gln Cys Pro Ala
20 25 30 35

Leu Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn Arg
40 45 50

Asn Leu Thr Glu Val Pro Thr Asp Leu Pro Pro Tyr Val Arg Asn Leu
55 60 65

Phe Leu Thr Gly Asn Gln Leu Ala Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe Ala
70 75 80

Arg Val Pro Pro Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Asn Leu Ser Gly Ser
85 90 95

Arg Leu Glu Asp Val Gln Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Ser Leu
100 105 110 115

Arg Gln Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Ala Val Leu Ser Pro Phe
120 125 130

Ala Phe Ser Gly Ser Asn Ala Ser Val Ser Ala Pro Ser Pro Leu Val
135 140 145

Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Glu Asp Glu Arg Asn Asn
150 155 160

Arg Ser Phe Glu Gly Met Val Val Ala Ala Leu Arg Ala Gly Gly Ala
165 170 175

Leu His Gly Leu His Arg Leu Glu Leu Ala Ser Asn His Phe Leu Tyr
180 185 190 195

Leu Pro Arg Asp Val Leu Ala Gln Leu Pro Ser Leu Arg His Leu Asp
200 205 210

Leu Ser Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu Thr Tyr Val Ser Phe Arg Asn
215 220 225

Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu Glu Asp Asn Ala Leu Lys Val
230 235 240

Leu His Asn Gly Thr Leu Ala Glu Leu Gln Gly Leu Pro His Val Arg
245 250 255

Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys His Met Ala Asp
260 265 270 275

Met Val Ala Trp Leu Lys Glu Thr Glu Val Val Gln Gly Lys Tyr Gln
280 285 290

Leu Thr Cys Ala Phe Pro Glu Lys Met Arg Asn Arg Val Leu Leu Glu
295 300 305

Leu Asn Ser Ala Asp Leu Asp Cys Asp Pro Ile Leu Pro Pro Ser Leu
 310 315 320

Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile Val Leu Ala Leu Ile Gly
 325 330 335

<210> 86
 <211> 420
 <212> PRT
 <213> Cynomologous monkey

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(29)
 <223> leader sequence

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (30)..(420)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30)..(356)
 <223> ectodomain

<400> 86

Met Pro Gly Gly Cys Ser Arg Gly Pro Ala Ala Gly Asp Gly Arg Leu
 -25 -20 -15

Arg Leu Ala Arg Leu Ala Leu Val Leu Leu Gly Trp Val Ser Ser Ser
 -10 -5 -1 1

Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ser Ser Phe Ser Ser Ser Ala Pro Phe Leu
 5 10 15

Ala Ser Ala Ala Ser Ala Gln Pro Pro Leu Pro Asp Gln Cys Pro Ala
 20 25 30 35

Leu Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn Arg
 40 45 50

Asn Leu Thr Glu Val Pro Thr Asp Leu Pro Leu Tyr Val Arg Asn Leu
 55 60 65

Phe Leu Thr Gly Asn Gln Leu Ala Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe Ala
 70 75 80

Arg	Arg	Pro	Pro	Leu	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Leu	Asn	Leu	Ser	Gly	Ser	85	90	95	
Arg	Leu	Asp	Glu	Val	Arg	Ala	Gly	Ala	Phe	Glu	His	Leu	Pro	Ser	Leu	100	105	110	115
Arg	Gln	Leu	Asp	Leu	Ser	His	Asn	Pro	Leu	Ala	Tyr	Leu	Ser	Pro	Phe	120	125	130	
Ala	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ala	Ser	Ile	Ser	Ala	Pro	Ser	Pro	Leu	Val	135	140	145	
Glu	Leu	Ile	Leu	Asn	His	Ile	Val	Pro	Pro	Asp	Asp	Lys	Arg	Gln	Asn	150	155	160	
Arg	Ser	Phe	Glu	Gly	Met	Val	Ala	Ala	Ala	Leu	Val	Ala	Gly	Arg	Ala	165	170	175	
Leu	Gln	Gly	Leu	His	Leu	Leu	Glu	Leu	Ala	Ser	Asn	His	Phe	Leu	Tyr	180	185	190	195
Leu	Pro	Arg	Asp	Val	Leu	Ala	Gln	Leu	Pro	Ser	Leu	Arg	Tyr	Leu	Asp	200	205	210	
Leu	Ser	Asn	Asn	Ser	Leu	Val	Ser	Leu	Thr	Tyr	Val	Ser	Phe	Arg	Asn	215	220	225	
Leu	Thr	His	Leu	Glu	Ser	Leu	His	Leu	Glu	Asp	Asn	Ala	Leu	Lys	Val	230	235	240	
Leu	His	Asn	Gly	Thr	Leu	Ala	Glu	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	His	Val	Arg	245	250	255	
Val	Phe	Leu	Asp	Asn	Asn	Pro	Trp	Val	Cys	Asp	Cys	His	Met	Ala	Asp	260	265	270	275
Met	Val	Thr	Trp	Leu	Lys	Gln	Thr	Glu	Val	Val	Gln	Gly	Lys	Asp	Arg	280	285	290	
Leu	Thr	Cys	Ala	Phe	Pro	Glu	Lys	Met	Arg	Asn	Arg	Val	Leu	Leu	Glu	295	300	305	

Leu Asn Ser Ala Asp Leu Asp Cys Asp Pro Ile Leu Pro Pro Ser Leu
310 315 320

Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile Val Leu Ala Leu Ile Gly Ala
325 330 335

Ile Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Asn Arg Lys Gly Ile Lys Lys Trp
340 345 350 355

Met His Asn Ile Arg Asp Ala Cys Arg Asp His Met Glu Gly Tyr His
360 365 370

Tyr Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Asp Pro Arg Leu Thr Asn Leu Ser Ser
375 380 385

Asn Ser Asp Val
390

<210> 87
<211> 420
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87

Met Pro Gly Gly Cys Ser Arg Gly Pro Ala Ala Gly Asp Gly Arg Leu
1 5 10 15

Arg Leu Ala Arg Leu Ala Leu Val Leu Leu Gly Trp Val Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Pro Thr Ser Ser Ala Ser Ser Phe Ser Ser Ser Ala Pro Phe Leu
35 40 45

Ala Ser Ala Val Ser Ala Gln Pro Pro Leu Pro Asp Gln Cys Pro Ala
50 55 60

Leu Cys Glu Cys Ser Glu Ala Ala Arg Thr Val Lys Cys Val Asn Arg
65 70 75 80

Asn Leu Thr Glu Val Pro Thr Asp Leu Pro Ala Tyr Val Arg Asn Leu
85 90 95

Phe Leu Thr Gly Asn Gln Leu Ala Val Leu Pro Ala Gly Ala Phe Ala
100 105 110

325

Arg Arg Pro Pro Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Asn Leu Ser Gly Ser
115 120 125

Arg Leu Asp Glu Val Arg Ala Gly Ala Phe Glu His Leu Pro Ser Leu
130 135 140

Arg Gln Leu Asp Leu Ser His Asn Pro Leu Ala Asp Leu Ser Pro Phe
145 150 155 160

Ala Phe Ser Gly Ser Asn Ala Ser Val Ser Ala Pro Ser Pro Leu Val
165 170 175

Glu Leu Ile Leu Asn His Ile Val Pro Pro Glu Asp Glu Arg Gln Asn
180 185 190

Arg Ser Phe Glu Gly Met Val Val Ala Ala Leu Leu Ala Gly Arg Ala
195 200 205

Leu Gln Gly Leu Arg Arg Leu Glu Leu Ala Ser Asn His Phe Leu Tyr
210 215 220

Leu Pro Arg Asp Val Leu Ala Gln Leu Pro Ser Leu Arg His Leu Asp
225 230 235 240

Leu Ser Asn Asn Ser Leu Val Ser Leu Thr Tyr Val Ser Phe Arg Asn
245 250 255

Leu Thr His Leu Glu Ser Leu His Leu Glu Asp Asn Ala Leu Lys Val
260 265 270

Leu His Asn Gly Thr Leu Ala Glu Leu Gln Gly Leu Pro His Ile Arg
275 280 285

Val Phe Leu Asp Asn Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys His Met Ala Asp
290 295 300

Met Val Thr Trp Leu Lys Glu Thr Glu Val Val Gln Gly Lys Asp Arg
305 310 315 320

Leu Thr Cys Ala Tyr Pro Glu Lys Met Arg Asn Arg Val Leu Leu Glu
325 330 335

Leu Asn Ser Ala Asp Leu Asp Cys Asp Pro Ile Leu Pro Pro Ser Leu
340 345 350

Gln Thr Ser Tyr Val Phe Leu Gly Ile Val Leu Ala Leu Ile Gly Ala
355 360 365

Ile Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Asn Arg Lys Gly Ile Lys Lys Trp
370 375 380

Met His Asn Ile Arg Asp Ala Cys Arg Asp His Met Glu Gly Tyr His
385 390 395 400

Tyr Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Asp Pro Arg Leu Thr Asn Leu Ser Ser
405 410 415

Asn Ser Asp Val
420

<210> 88
<211> 130
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88

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

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

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

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

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

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

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

327

Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val
115 120 125

Ser Ser
130

<210> 89
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89

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

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

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 90
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys

<210> 91
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 92
<211> 98

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 92

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

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

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg

<210> 93
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 93

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

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Arg

<210> 94
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94

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> 95
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 95

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> 96
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96

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> 97
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97

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> 98
<211> 101
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 98

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> 99
<211> 96

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 99

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

Patente de
Invención

08-95703

2/2

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 545/08 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 9 de septiembre de 2008 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Cesión a WYETH del invento titulado "ANTICUERPOS ANTI-5T4 Y USOS DE LOS MISMOS". Certificación notarial suscrita por Barbara A. Kiely, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

AM102325 L3

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, Michelle L. McGowan, Asociada para Registros Internacionales de Wyeth, certifico por la presente que la copia adjunta ha sido comparada con la Cesión original (para la U.S.S.N. 60/891,248, y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero, para el invento titulado: "ANTICUERPOS ANTI-5T4 Y USOS DE LOS MISMOS"), fechada el 9 de marzo de 2007 de Kodangattil R. Sreekumar; y fechada el 19 de marzo de 2007 de Kimberly A. Marquette, Lioudmila Tchistiakova y Davinder Gill; y fechada el 21 de marzo de 2007 de Philip Ross Hamann; y fechada el 22 de marzo de 2007 de Erwin R. Boghaert, Kiran Khandke y Arthur Kunz; y fechada el 23 de marzo de 2007 de Nitin K. Damle a Wyeth y que la citada copia es fiel copia del original.

Dado a los 7 días del mes de julio de 2008, en Madison, Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

WYETH

(Fdo.) Michelle L. McGowan
Michelle L. McGowan
Asociada para Registros Internacionales

PARA USO EN COLOMBIA

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

Estado de Nueva Jersey)
)
Condado de Morris)

**MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01510
DE MINISTERIO**

Cesión de Inventario

(2) Nombre Completo del Inventor: Nitin K. DAMLE
Residencia: 53 Stevenson Lane, Upper Saddle River, NJ 07458
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(3) Nombre Completo del Inventor: Philip Ross HAMANN
Residencia: 9 Jacobs Road, Thiells, NY 10984
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(4) Nombre Completo del Inventor: Kiran KHANDKE
Residencia: 120 E. Allison Avenue, Nanuet, NY 10954
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(5) Nombre Completo del Inventor: Arthur KUNZ
Residencia: 11 Jennifer Drive, New City, NY 10956
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(6) Nombre Completo del Inventor: Kimberly A. MARQUETTE
Residencia: 66 Springfield Street, Apt. #1, Somerville, MA 02143
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(7) Nombre Completo del Inventor: Lioudmila TCHISTIAKOVA
Residencia: 19 Abbot Bridge Drive, Andover, MA 01810
Ciudadanía: Canadá

(8) Nombre Completo del Inventor: Davinder GILL
Residencia: 20 Charlotte Drive, Andover, MA 01810
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(9) Nombre Completo del Inventor: Kodangattil R. SREEKUMAR
Residencia: 140 Parker Road, Plainsboro, NJ 08536
Ciudadanía: India

por la presente vende, cede y traspasa a la CESIONARIA:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, Nueva Jersey 07940

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 07815
DE MINISTERIO

y a los sucesores, cesionarios y representantes legales de la CESIONARIA, todo derecho, título e interés para los Estados Unidos y sus posesiones territoriales y en todos los países extranjeros, incluidos todos los derechos a reclamar prioridad, en y sobre el invento titulado:

ANTICUERPOS ANTI-5T4 Y USOS DE LOS MISMOS

e inventado por el CEDENTE y los siguientes inventores adicionales, en caso de haberlos:

y el cual se encuentra en la Solicitud Provisional de los E.U. No. 60/891,248 presentada el: 23 de febrero de 2007

☐ Yo/nosotros, el CEDENTE que firma/firmamos a continuación, por la presente autorizo/autorizamos y solicito/solicitamos la inserción anterior del número de solicitud y fecha de presentación, una vez que éstos se conozcan,

[marcar también si se están cediendo solicitud(es) extranjera(s)]

☒ y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero,

incluyendo el derecho a reclamar prioridad, incluidas todas y cada una de las mejoras allí divulgadas, y en y sobre todas las Patentes que hayan de obtenerse para dicho invento en virtud de la solicitud anterior o cualquier solicitud provisional, no provisional, de continuación, divisional, de renovación o sustituta de la misma posteriormente presentada, y respecto de Patentes, cualquier reemisión o reexamen de las mismas.

El CEDENTE pacta por el presente que no se ha hecho ni se hará ni se realizará ninguna cesión, venta, acuerdo o gravamen que pudiese entrar en conflicto con esta cesión.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 11818
DE MINISTERIO

338

El CEDENTE autoriza a la CESIONARIA a presentar solicitudes y recibir Patentes para dicho invento en cualquiera de dichos países en su propio nombre, o en nombre del CEDENTE, a su elección.

El CEDENTE pacta y acuerda suscribir u obtener cualquier garantía adicional necesaria del título sobre dicho invento y cualquier Patente que pueda expedirse para el mismo y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA, entregar cualquier testimonio en cualquier interferencia, litigio o proceso relacionado con el mismo y otorgar todos los documentos que puedan ser necesarios o convenientes para perfeccionar el título sobre dicho invento o cualquier Patente que pueda otorgarse para el mismo a la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA, suscribir cualquier continuación, continuación en parte, solicitud divisional, de renovación o sustituta de la misma, y en cuanto a Patentes y reemisión o reexamen de las mismas, o cualquier otra solicitud adicional de Patente para dicho invento o cualquier parte del mismo, todas las cuales solicitudes y cualesquiera Patentes que se expidan sobre las mismas son por la presente cedidas a la CESIONARIA, y hará todos los juramentos o declaraciones lícitos, y realizará todo los actos lícitos requeridos para adquirir las mismas, sin otra compensación, pero por cuenta de la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

El CEDENTE autoriza y solicita al Comisionado de Patentes expedir todas y cada una de las Patentes de los Estados Unidos para dicho invento, resultantes de cualquiera de las anteriores solicitudes a su CESIONARIA.

(Fdo.) Erwin R. Boghaert
Erwin R. BOGHAERT

Marzo 22, 2007
Fecha

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 4745
DE MINISTERIO

Estado de Nueva York }
ss:
Condado de Rockland }

(Fdo.) RoseAnn D. Jastrow
Notario Público

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01615
DE MINISTERIA

Marzo 23, 2007

Estado de Nueva York }
 Condado de Rockland } ss:

(Fdo.) RoseAnn D. Jastrow
Notario Público

[Sello] ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA6085816
HABILITADA EN EL CONDADO DE ROCKLAND
MI COMISIÓN EXPIRA 01-06-2011

(Fdo.) Philip Ross Hamann
Philip Ross HAMANN

Marzo 21, 2007
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York }
 ss:
Condado de Rockland }

A los 21 días del mes de marzo de 2007, compareció personalmente ante mí Philip Ross HAMANN, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Janice A. White
Notario Público

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01-01-01
DE MINISTROS

[Sello] JANICE A. WHITE
Notario Público – Estado de Nueva York
No. 01-WH6052604
Habilitada en el Condado de Rockland
Mi Comisión Expira el 12-26-2010

(Fdo.) Kiran Khandke
Kiran KHANDKE

Marzo 22, 2007
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York }
 ss:
Condado de Rockland }

A los 22 días del mes de marzo de 2007, compareció personalmente ante mí Kiran KHANDKE, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) RoseAnn D. Jastrow
Notario Público

HABILITADA EN EL CONDADO DE ROCKLAND
MI COMISIÓN EXPIRA 01-06-2011

Fecha

Estado de Nueva York }
 Condado de Rockland } ss:

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01115
DE MINISTERIA

JANICE A. WHITE
Notario Público – Estado de Nueva York
No. 01-WH6052604
Habilitada en el Condado de Rockland
Mi Comisión Expira el 12-26-2010

Fecha

Estado de Massachusetts }
ss:
Condado de Middlesex }

(Fdo.) Florence Ann McColgan
Notario Público

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0176
DE MINISTERIA

Marzo 19, 2007

Estado de Massachusetts }
SS:
Condado de Middlesex }

(Fdo.) Florence Ann McColgan
Notario Público

[Sello] FLORENCE ANN McCOLGAN
NOTARIO PÚBLICO
Estado de Massachusetts
Mi comisión expira el 29 de marzo de 2007

Marzo 19, 2007

SS:

Estado de Massachusetts }
Condado de Middlesex } ss:

A los 19 días del mes de marzo de 2007, compareció personalmente ante mí Davinder GILL, quien, mediante prueba satisfactoria de identidad en la forma de una licencia de conducción, me demostró ser la persona cuyo nombre suscribe el instrumento anterior o adjunto, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

ARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0151
DE MINISTERIA

[Sello] FLORENCE ANN McCOLGAN
NOTARIO PÚBLICO
Estado de Massachusetts
Mi comisión expira el 29 de marzo de 2007

Marzo 9, 2007

\$\$:

Estado de Nueva Jersey }
Condado de Middlesex } ss:

A los 9 días del mes de marzo de 2007, compareció personalmente ante mí Kodangattil R. SREEKUMAR, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) Marilyn Winkler
Notario Público

[Sello] MARILYN WINKLER
NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
MI COMISIÓN EXPIRA EL 1/25/2012

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- 1. País: Estados Unidos de América
- 2. Este documento público ha sido firmado por: Barbara A. Kiely
- 3. actuando en calidad de: Notario Público de Nueva Jersey
- 4. lleva el sello/timbre de: Barbara A. Kiely, Notario

CERTIFICADO

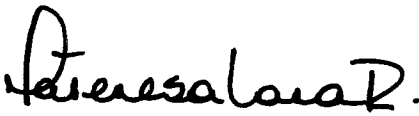
- 5. en Trenton, Nueva Jersey
- 6. el día 10 de julio de 2008
- 7. por R. David Rousseau, TESORERO DE NUEVA JERSEY
- 8. No. A332876
- 9. Sello/Timbre:
- 10. Firma

(Sello del Estado
de Nueva Jersey)

(Fdo.) R. David Rousseau

=====

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.


María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

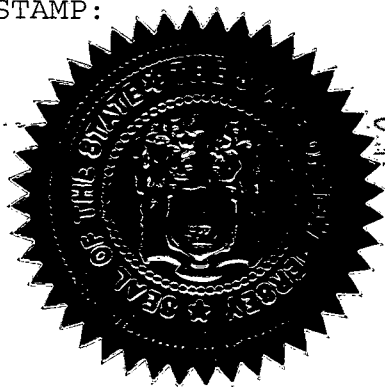
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
BARBARA A KIELY
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
BARBARA A KIELY, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 10TH DAY OF JULY 2008
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A332876
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



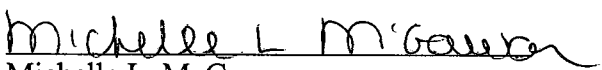
AM102325 L3

AFFIDAVIT

I, Michelle L. McGowan, International Filing Associate of Wyeth, do hereby certify that the attached copy has been compared with the original Assignment (for U.S.S.N. 60/891,248, and any legal equivalent thereof in a foreign country, for the invention entitled: "ANTI-5T4 ANTIBODIES AND USES THEREOF") dated March 9, 2007 from Kodangattil R. Sreekumar; and dated March 19, 2007 from Kimberly A. Marquette, Lioudmila Tchistiakova and Davinder Gill; and dated March 21, 2007 from Philip Ross Hamann; and dated March 22, 2007 from Erwin R. Boghaert, Kiran Khandke and Arthur Kunz; and dated March 23, 2007 from Nitin K. Damle to Wyeth and that the said copy is a true copy of the original.

Dated this 7th day of July, 2008, at Madison, New Jersey, United States of America.

WYETH

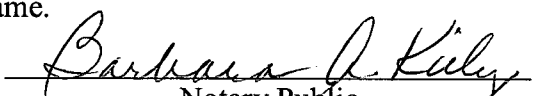

Michelle L. McGowan
International Filing Associate

TO BE USED IN COLOMBIA

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey)
)
County of Morris)

On this 7th day of July, 2008, before me personally appeared Michelle L. McGowan, International Filing Associate of Wyeth, to me known and known to me to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and she acknowledged to me that she executed the same.


Notary Public

Barbara A. Kiely ID. 33893
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires June 20, 2009

347

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

-
- (1) Full Name of Inventor: Erwin R. BOGHAERT
Residence: 93 Ludlam Road, Monroe, NY 10950
Citizenship: Belgium
-
- (2) Full Name of Inventor: Nitin K. DAMLE
Residence: 53 Stevenson Lane, Upper Saddle River, NJ 07458
Citizenship: United States of America
-
- (3) Full Name of Inventor: Philip Ross HAMANN
Residence: 9 Jacobs Road, Thiells, NY 10984
Citizenship: United States of America
-
- (4) Full Name of Inventor: Kiran KHANDKE
Residence: 120 E. Allison Avenue, Nanuet, NY 10954
Citizenship: United States of America
-
- (5) Full Name of Inventor: Arthur KUNZ
Residence: 11 Jennifer Drive, New City, NY 10956
Citizenship: United States of America
-
- (6) Full Name of Inventor: Kimberly A. MARQUETTE
Residence: 66 Springfield Street, Apt. #1, Somerville, MA 02143
Citizenship: United States of America
-
- (7) Full Name of Inventor: Lioudmila TCHISTIAKOVA
Residence: 19 Abbot Bridge Drive, Andover, MA 01810
Citizenship: Canada
-
- (8) Full Name of Inventor: Davinder GILL ✓
Residence: 20 Charlotte Drive, Andover, MA 01810
Citizenship: United States of America
-

348

- (9) Full Name of Inventor: Kodangattil R. SREEKUMAR
Residence: 140 Parker Road, Plainsboro, NJ 08536
Citizenship: India

hereby sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:

ANTI-5T4 ANTIBODIES AND USES THEREOF

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

and which is found in U.S. Provisional Application No. 60/891,248 filed on: February 23, 2007

☐ I/we the ASSIGNOR signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,

[also check if foreign application(s) is(are) also being assigned]

☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

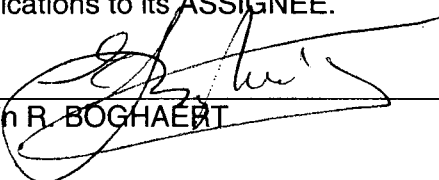
ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all

lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.



Erwin R. BOGHAERT

3/22/07

Date

ACKNOWLEDGMENT

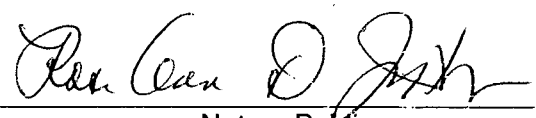
State of New York

ss:

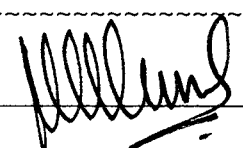
County of Rockland

On the 22nd day of March 2007, Erwin R. BOGHAERT personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA6085816
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 01-06-2011



Notary Public

~~~~~  
  
\_\_\_\_\_  
Nitin K. DAMLE

3-23-07  
\_\_\_\_\_  
Date

ACKNOWLEDGMENT

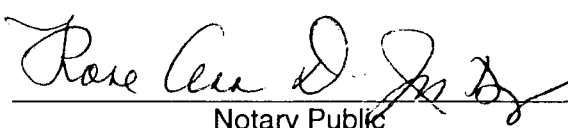
State of New York

ss:

County of Rockland

On the 23<sup>rd</sup> day of March 2007, Nitin K. DAMLE personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

ROSEANN D. JASTROW  
NO. 01JA6085816  
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY  
MY COMMISSION EXPIRES 01-06-2011

  
\_\_\_\_\_  
Notary Public

350

Philip Ross Hamann  
Philip Ross HAMANN

March 21, 2007  
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York  
County of Rockland

SS:

On the 21 day of March 2007, Philip Ross HAMANN personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

JANICE A. WHITE  
Notary Public - State of New York  
No. 01-WH6052804  
Qualified in Rockland County  
My Commission Expires 12-26-2010

Janice A. White  
Notary Public

Kiran Khandke  
Kiran KHANDKE

22<sup>nd</sup> March 192007  
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York  
County of Rockland

SS:

On the 22nd day of March 2007, Kiran KHANDKE personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

ROSEANN D. JASTROW  
NO. 01JA6085816  
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY  
MY COMMISSION EXPIRES 01-06-2011

Rose Ann D. Jastrow  
Notary Public

351

Docket No: AM102325 L3  
Patent

  
\_\_\_\_\_  
Arthur KUNZ

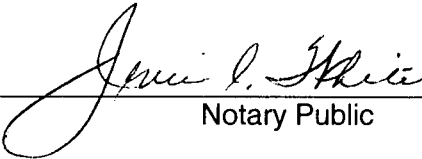
\_\_\_\_\_  
Date Mar 22, 07

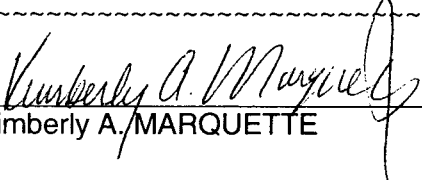
ACKNOWLEDGMENT

State of New York  
County of Rockland ss:

On the 22 day of March 2007, Arthur KUNZ personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

JANICE A. WHITE  
Notary Public - State of New York  
No. 01-WH6052604  
Qualified in Rockland County  
My Commission Expires 12-26-2010

  
\_\_\_\_\_  
Notary Public

~~~~~  


Kimberly A. MARQUETTE

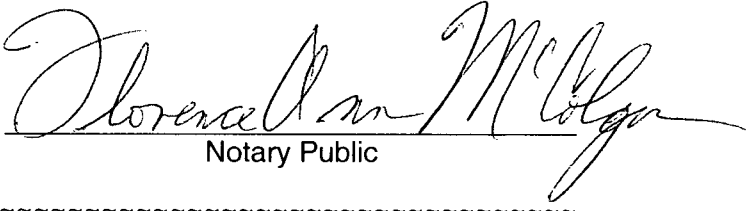
Date March 19, 2007

ACKNOWLEDGMENT

State of Massachusetts
County of Middlesex ss:

On the 19 day of March 2007, before me, personally appeared Kimberly A. MARQUETTE, proved to me through satisfactory evidence of identity which was license to be the person whose name is signed on the preceding or attached document, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

FLORENCE ANN McCOLGAN
NOTARY PUBLIC
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires March 29, 2007



Notary Public

352

Lioudmila TCHISTIAKOVA
Lioudmila TCHISTIAKOVA

19 March 2007
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Massachusetts

County of Middlesex

ss:

On the 19 day of March 2007, before me, personally appeared Lioudmila TCHISTIAKOVA, proved to me through satisfactory evidence of identity which was license to be the person whose name is signed on the preceding or attached document, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

FLORENCE ANN MCCOLGAN
NOTARY PUBLIC
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires March 29, 2007

Florence Ann McColgan
Notary Public

Davinder Gill
Davinder GILL

19 March 2007
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Massachusetts

County of Middlesex

ss:

On the 19 day of March 2007, before me, personally appeared Davinder GILL, proved to me through satisfactory evidence of identity which was license to be the person whose name is signed on the preceding or attached document, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth

FLORENCE ANN MCCOLGAN
NOTARY PUBLIC
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires March 29, 2007

Florence Ann McColgan
Notary Public

353

Kodangattil Sreekumar
Kodangattil R. SREEKUMAR

03/09/2007
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey

County of Middlesex

ss:

On the 9th day of March 2007, Kodangattil R. SREEKUMAR personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

MARILYN WINKLER
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
MY COMMISSION EXPIRES 1/25/2007

Marilyn Winkler
Notary Public

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 546/08 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 9 de septiembre de 2008 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

= = = = =
Cesión a WYETH del invento titulado "ANTICUERPOS 5T4 Y USOS DE LOS MISMOS". Certificación notarial suscrita por Barbara A. Kiely, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

AM102325

DECLARACIÓN JURAMENTADA

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA

Yo, Michelle L. McGowan, Asociada para Registros Internacionales de Wyeth, certifico por la presente que la copia adjunta ha sido comparada con la Cesión original (para la U.S.S.N. 60/781,346, y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero, para el invento titulado: "ANTICUERPOS 5T4 Y USOS DE LOS MISMOS"), fechada el 31 de marzo de 2006 de Lioudmila Tchistiakova; y fechada el 5 de abril de 2006 de Kimberly A. Marquette; y fechada el 6 de abril de 2006 de Erwin R. Boghaert, Philip Ross Hamann y Arthur Kunz; y fechada el 7 de abril de 2006 de Kiran Khandke; y fechada el 11 de abril de 2006 de Nitin K. Damle a Wyeth y que la citada copia es fiel copia del original.

Dado a los 7 días del mes de julio de 2008, en Madison, Nueva Jersey, Estados Unidos de América.

WYETH

(Fdo.) Michelle L. McGowan
Michelle L. McGowan
Asociada para Registros Internacionales

PARA USO EN COLOMBIA

Estado de Nueva Jersey)
)
 Condado de Morris)

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 07410
DE MINISTERIA

(2) Nombre Completo del Inventor: Nitin K. DAMLE
Residencia: 53 Stevenson Lane, Upper Saddle River, NJ 07458
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(3) Nombre Completo del Inventor: Philip Ross HAMANN
Residencia: 9 Jacobs Road, Thiells, NY 10984
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(4) Nombre Completo del Inventor: Kiran KHANDKE
Residencia: 120 E. Allison Avenue, Nanuet, NY 10954
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(5) Nombre Completo del Inventor: Arthur KUNZ
Residencia: 11 Jennifer Drive, New City, NY 10956
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(6) Nombre Completo del Inventor: Kimberly A. MARQUETTE
Residencia: 66 Springfield Street, Apt. #1, Somerville, MA 02143
Ciudadanía: Estados Unidos de América

(7) Nombre Completo del Inventor: Lioudmila TCHISTIAKOVA
Residencia: 19 Abbot Bridge Drive, Andover, MA 01810
Ciudadanía: Canadá

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION MA-11616
DE MINUTERIA

por la presente vende, cede y traspasa a la CESIONARIA:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, Nueva Jersey 07940

y a los sucesores, cesionarios y representantes legales de la CESIONARIA,
todo derecho, título e interés para los Estados Unidos y sus posesiones
territoriales y en todos los países extranjeros, incluidos todos los derechos a
reclamar prioridad, en y sobre el invento titulado:

ANTICUERPOS 5T4 Y USOS DE LOS MISMOS

357

e inventado por el CEDENTE y los siguientes inventores adicionales, en caso de haberlos:

y el cual se encuentra en la Solicitud Provisional de los E.U. No. 60/781,346 presentada el: 10 de marzo de 2006

[] Yo/nosotros, el CEDENTE que firma/firmamos a continuación, por la presente autorizo/autorizamos y solicito/solicitamos la inserción anterior del número de solicitud y fecha de presentación, una vez que éstos se conozcan,

[marcar también si se están cediendo solicitud(es) extranjera(s)]

[X] y cualquier equivalente legal de la misma en un país extranjero,

incluyendo el derecho a reclamar prioridad, incluidas todas y cada una de las mejoras allí divulgadas, y en y sobre todas las Patentes que hayan de obtenerse para dicho invento en virtud de la solicitud anterior o cualquier solicitud provisional, no provisional, de continuación, divisional, de renovación o sustituta de la misma posteriormente presentada, y respecto de Patentes, cualquier reemisión o reexamen de las mismas.

El CEDENTE pacta por el presente que no se ha hecho ni se hará ni se realizará ninguna cesión, venta, acuerdo o gravamen que pudiese entrar en conflicto con esta cesión.

El CEDENTE autoriza a la CESIONARIA a presentar solicitudes y recibir Patentes para dicho invento en cualquiera de dichos países en su propio nombre, o en nombre del CEDENTE, a su elección.

El CEDENTE pacta y acuerda suscribir u obtener cualquier garantía adicional necesaria del título sobre dicho invento y cualquier Patente que

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01616
DE MINISTERIO

pueda expedirse para el mismo y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA, entregar cualquier testimonio en cualquier interferencia, litigio o proceso relacionado con el mismo y otorgar todos los documentos que puedan ser necesarios o convenientes para perfeccionar el título sobre dicho invento o cualquier Patente que pueda otorgarse para el mismo a la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales y, en cualquier momento, a solicitud y por cuenta de la CESIONARIA, suscribir cualquier continuación, continuación en parte, solicitud divisional, de renovación o sustituta de la misma, y en cuanto a Patentes y reemisión o reexamen de las mismas, o cualquier otra solicitud adicional de Patente para dicho invento o cualquier parte del mismo, todas las cuales solicitudes y cualesquiera Patentes que se expidan sobre las mismas son por la presente cedidas a la CESIONARIA, y hará todos los juramentos o declaraciones lícitos, y realizará todo los actos lícitos requeridos para adquirir las mismas, sin otra compensación, pero por cuenta de la CESIONARIA, sus sucesores, cesionarios u otros representantes legales.

El CEDENTE autoriza y solicita al Comisionado de Patentes expedir todas y cada una de las Patentes de los Estados Unidos para dicho invento, resultantes de cualquiera de las anteriores solicitudes a su CESIONARIA.

(Fdo.) Erwin R. Boghaert
Erwin R. BOGHAERT

Abril 6, 2006
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York }
 ss:
Condado de Rockland }

A los 6 días del mes de abril de 2006, compareció personalmente ante mí Erwin R. BOGHAERT, a quien conozco como la misma persona descrita en el

TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 10.000
DE MINISTERIO

(Fdo.) RoseAnn D. Jastrow
Notario Público

Abril 11, 2006
Fecha

Estado de Nueva York }
ss:
Condado de Rockland }

(Fdo.) Janice A. White
Notario Público

Abril 6, 2006
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York }
 Condado de Rockland } ss:

A los 6 días del mes de abril de 2006, compareció personalmente ante mí Philip Ross HAMANN, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) RoseAnn D. Jastrow
Notario Público

[Sello] ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA6085816
HABILITADA EN EL CONDADO DE ROCKLAND
MI COMISIÓN EXPIRA 01-06-2007

(Fdo.) Kiran Khandke
Kiran KHANDKE

Abril 07, 2006
Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York }
ss:
Condado de Rockland }

A los 7 días del mes de abril de 2006, compareció personalmente ante mí Kiran KHANDKE, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) RoseAnn D. Jastrow
Notario Público

[Sello] ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA6085816
HABILITADA EN EL CONDADO DE ROCKLAND
MI COMISIÓN EXPIRA 01-06-2007

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01514
DE MINISTERIO

Abril 06, 2006

Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Nueva York }
Condado de Rockland } ss:

A los 6 días del mes de abril de 2006, compareció personalmente ante mí Arthur KUNZ, a quien conozco como la misma persona descrita en el instrumento anterior y quien lo otorgó, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

(Fdo.) RoseAnn D. Jastrow
Notario Público

[Sello]

ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA6085816
HABILITADA EN EL CONDADO DE ROCKLAND
MI COMISIÓN EXPIRA 01-06-2007

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0140
DE MINISTERIA

Abril 05, 2006

Fecha

RECONOCIMIENTO

Estado de Massachusetts }
Condado de Middlesex }
SS:

A los 5 días del mes de abril de 2006, compareció personalmente ante mí Kimberly A. MARQUETTE, quien, mediante prueba satisfactoria de identidad en la forma de una licencia de conducción, me demostró ser la persona cuyo nombre suscribe el instrumento anterior o adjunto, y reconoció haber otorgado el mismo, por su propia voluntad y para los propósitos allí señalados.

[Sello] LORI M. SMITH
Notario Público
Estado de Massachusetts
Mi comisión expira el 22 de septiembre de 2011

Marzo 31, 2006
Fecha

Estado de Massachusetts }
ss: }
Condado de Middlesex }

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 0126
DE MINISTERIA

[Sello] LORI M. SMITH
Notario Público
Estado de Massachusetts
Mi comisión expira el 22 de septiembre de 2011

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por: Barbara A. Kiely

- 3. actuando en calidad de: Notario Público de Nueva Jersey
- 4. lleva el sello/timbre de: Barbara A. Kiely, Notario

CERTIFICADO

- 5. en Trenton, Nueva Jersey
- 6. el día 10 de julio de 2008
- 7. por R. David Rousseau, TESORERO DE NUEVA JERSEY
- 8. No. A332874
- 9. Sello/Timbre:
- 10. Firma

(Sello del Estado
de Nueva Jersey)

(Fdo.) R. David Rousseau

=====

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE MINISTERIO DE JUSTICIA


María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
BARBARA A KIELY
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
BARBARA A KIELY, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 10TH DAY OF JULY 2008
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A332874
9. SEAL/STAMP
10. SIGNATURE



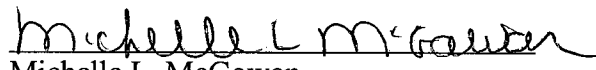
AM102325

AFFIDAVIT

I, Michelle L. McGowan, International Filing Associate of Wyeth, do hereby certify that the attached copy has been compared with the original Assignment (for U.S.S.N. 60/781,346, and any legal equivalent thereof in a foreign country, for the invention entitled: "5T4 ANTIBODIES AND USES THEREOF") dated March 31, 2006 from Lioudmila Tchistiakova; and dated April 5, 2006 from Kimberly A. Marquette; and dated April 6, 2006 from Erwin R. Boghaert, Philip Ross Hamann and Arthur Kunz; and dated April 7, 2006 from Kiran Khandke; and dated April 11, 2006 from Nitin K. Damle to Wyeth and that the said copy is a true copy of the original.

Dated this 7th day of July, 2008, at Madison, New Jersey, United States of America.

WYETH

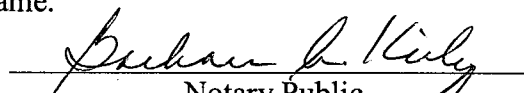

Michelle L. McGowan
International Filing Associate

TO BE USED IN COLOMBIA

ACKNOWLEDGMENT

State of New Jersey)
)
County of Morris)

On this 7th day of July, 2008, before me personally appeared Michelle L. McGowan, International Filing Associate of Wyeth, to me known and known to me to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and she acknowledged to me that she executed the same.


Notary Public

Barbara A. Kiely ID. 33893
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires June 20, 2009

Assignment of Invention

In consideration of the payment by ASSIGNEE to ASSIGNOR of good and valuable consideration, the receipt of which is hereby acknowledged,
ASSIGNOR:

(1) Full Name of Inventor: Erwin R. BOGHAERT ✓
Residence: 93 Ludlam Road, Monroe, NY 10950
Citizenship: Belgium

(2) Full Name of Inventor: Nitin K. DAMLE ✓
Residence: 53 Stevenson Lane, Upper Saddle River, NJ 07458
Citizenship: United States of America

(3) Full Name of Inventor: Philip Ross HAMANN ✓
Residence: 9 Jacobs Road, Thiells, NY 10984
Citizenship: United States of America

(4) Full Name of Inventor: Kiran KHANDKE ✓
Residence: 120 E. Allison Avenue, Nanuet, NY 10954
Citizenship: United States of America

(5) Full Name of Inventor: Arthur KUNZ ✓
Residence: 11 Jennifer Drive, New City, NY 10956
Citizenship: United States of America

(6) Full Name of Inventor: Kimberly A. MARQUETTE ✓
Residence: 66 Springfield Street, Apt. #1, Somerville, MA 02143
Citizenship: United States of America

(7) Full Name of Inventor: Lioudmila TCHISTIAKOVA ✓
Residence: 19 Abbot Bridge Drive, Andover, MA 01810
Citizenship: Canada

hereby sells, assigns and transfers to ASSIGNEE:

Wyeth
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940

and the successors, assigns and legal representatives of the ASSIGNEE the entire right, title and interest for the United States and its territorial possessions and in all foreign countries, including all rights to claim priority, in and to the invention entitled:
5T4 ANTIBODIES AND USES THEREOF

and invented by ASSIGNOR and the following additional inventors, if any:

and which is found in U.S. Provisional Application No. 60/781,346 filed on: March 10, 2006

☐ I/we the ASSIGNOR signing below, hereby authorize and request insertion above of the application number and filing date, when they become known,

[also check if foreign application(s) is(are) also being assigned]

☒ and any legal equivalent thereof in a foreign country,

including the right to claim priority, including any and all improvements disclosed therein, and in and to all Letters Patent to be obtained for said invention by the above application or any subsequently filed provisional, nonprovisional, continuation, divisional, renewal, or substitute thereof, and as to Letters Patent any reissue or re-examination thereof.

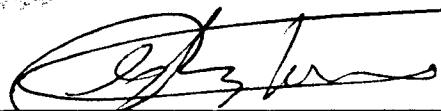
ASSIGNOR hereby covenants that no assignment, sale, agreement or encumbrance has been or will be made or entered into which would conflict with this assignment.

ASSIGNOR authorizes ASSIGNEE to make applications for and to receive Letters patent for said invention in any of said countries in its own name, or in ASSIGNOR's name, at its election.

ASSIGNOR covenants and agrees to execute or procure any further necessary assurance of the title to said invention and any Letters Patent which may issue therefore and to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE deliver any testimony in any interference, litigation or proceeding related thereto and execute all papers that may be necessary or desirable to perfect the title to said invention or any Letters Patent which may be granted therefore in ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives, and that to, at any time, upon the request and at the expense of ASSIGNEE execute any continuation, continuation-in-part, divisional, renewal or substitute thereof, and as to Letters Patent and reissue or re-examination thereof, or any other additional applications of Letters Patent for said invention or any part thereof, all of which applications and any Letters Patent issuing thereon are hereby assigned to ASSIGNEE, and will make all rightful oaths or declarations, and do all lawful acts requisite for procuring the same therein, without further compensation, but at the expense of ASSIGNEE, its successors, assigns or other legal representatives.

ASSIGNOR authorizes and requests the Commissioner of Patents to issue any and all Letters Patent of the United States for said invention, resulting from any of the aforesaid applications to its ASSIGNEE.

368



Erwin R. BOGHAERT

4/6/06.

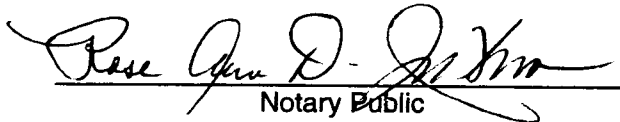
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }
County of Rockland } ss:

On the 6th day of April 2006, Erwin R. BOGHAERT personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA6085816
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 01-06-2007


Notary Public
Nitin K. DAMLE

4-11-06

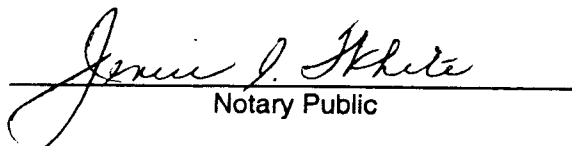
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }
County of Rockland } ss:

On the 11 day of April 2006, Nitin K. DAMLE personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

JANICE A. WHITE
NOTARY PUBLIC - STATE OF NEW YORK
NO 01-WH6052604
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 12-26-2006


Notary Public

Philip Ross Hamann
Philip Ross HAMANN

April 6, 2006
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }
County of Rockland } ss:

On the 6th day of April 2006, Philip Ross HAMANN personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA6085816
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 01-06-20 07

Rose Ann D. Jastrow
Notary Public

Kiran Khandke
Kiran KHANDKE

04-07-2006
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }
County of Rockland } ss:

On the 7th day of April 2006, Kiran KHANDKE personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA6085816
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 01-06-20 07

Rose Ann D. Jastrow
Notary Public

370

Arthur KUNZ
Arthur KUNZ

Apr 06, 06
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of New York }
County of Rockland } ss:

On the 6th day of April 2006, Arthur KUNZ personally appeared before me, known by me to be the same person described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.

ROSEANN D. JASTROW
NO. 01JA6086816
QUALIFIED IN ROCKLAND COUNTY
MY COMMISSION EXPIRES 01-06-2007

Rose Ann D. Jastrow
Notary Public

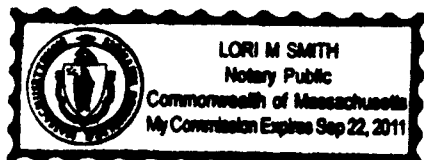
Kimberly A. Marquette
Kimberly A. MARQUETTE

04/05/2006
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Massachusetts }
County of Middlesex } ss:

On the 5 day of April 2006, before me, personally appeared Kimberly A. MARQUETTE, proved to me through satisfactory evidence of identity which was Driver's license to be the person whose name is signed on the preceding or attached document, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.



Lori M. Smith
Notary Public

371

L. Chistyakova
Lioudmila TCHISTIAKOVA

03.31.06
Date

ACKNOWLEDGMENT

State of Massachusetts }
County of Middlesex } ss:

On the 31 day of March 2006, before me, personally appeared Lioudmila TCHISTIAKOVA, proved to me through satisfactory evidence of identity which was Driver's license to be the person whose name is signed on the preceding or attached document, and acknowledged that he/she executed the same, of his/her own free will and for the purposes set forth.



Lori M. Smith
Notary Public

372

(21) N° de solicitud:				(51) Int Cl: C07K 16/00, A61K 39/395, C07K 14/47	
22) Fecha de solicitud:				(71) Solicitante(s) WYETH	
(30) Prioridad	(31) No.	32) Fecha	(33) País	(72) Inventor(es) BOGHAERT, Erwin, R DAMLE, Nitin, K y otros	
	60/781,346	10/03/06	US	(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ	
	60/891,248	23/02/07	US		
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 10/10/08				(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha: 20/09/07	
Fecha de presentación de la solicitud: 09/03/07				N° publicación: WO/2007/106744	
No. de solicitud PCT/US2007/063685					
(54) Título: ANTICUERPOS ANTI-5T4 Y USOS DE LOS MISMOS					

Reivindicaciones:

1. Anticuerpo que se une específicamente al antígeno 5T4 humano, caracterizado porque:
 - (a) comprende un dominio de unión a antígeno de los anticuerpos A1, A2 o A3 murinos;
 - (b) compete para la unión a 5T4 con los anticuerpos A1, A2 o A3 murinos;
 - (c) se une al epítipo de 5T4 unido por los anticuerpos A1, A2 o A3; o
 - (d) comprende un fragmento de unión a 5T4 de un anticuerpo de (a)-(c).

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 376

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO
Apoderado(a) y/o Representante de
WYETH

REFERENCIA	Radicación No.	8 95703
	Solicitud internacional	PCT/US2007/063685
	Fecha inicio fase nacional	10/10/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	8430
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

10 2 JUL. 2009

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

jfernand